

**EIN BEITRAG ZUR PEPTIDSYNTHESE MIT
PHOSPHOR-III-VERBINDUNGEN
ALS KONDENSATIONSMITTEL**

INAUGURALDISSERTATION

zur

**Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel**

von

Anton Ferdinand Tschopp
aus Ziefen/BL

1973

**Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck
1976**

EN BEITRAG ZUR PEPTIDSYNTHESE MIT
PHOSPHOR-III-VERBINDUNGEN
ALS KONDENSATIONSMITTEL

WALGUALESEBILUNG

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**EIN BEITRAG ZUR PEPTIDSYNTHESE MIT
PHOSPHOR-III-VERBINDUNGEN
ALS KONDENSATIONSMITTEL**

INAUGURALDISSERTATION

zur

**Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel**

von

**Anton Ferdinand Tschopp
aus Ziefen/BL**

**Clausthal-Zellerfeld
Böneck-Druck
1976**

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät auf Antrag der

Herren Professoren

Dr. M. Brenner

und

Dr. Ch. Tamm

Basel, den 6. November 1973



Prof. Dr. M. Eichler
Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. M. Brenner
im Institut für Organische Chemie der Universität
Basel ausgeführt.

Herrn Professor Dr. M. Brenner möchte ich für seine stete
Hilfe und das Interesse, das er dieser Arbeit entgegen-
brachte, herzlich danken.

I.	Inhaltsverzeichnis	1
1.	Verständnis und Wertung des menschlichen Lebens	1
1.1	Verständnis des menschlichen Lebens	1
1.2	Wertung des menschlichen Lebens	2
2.	Die menschliche Existenz	3
2.1	Die menschliche Existenz als Aufgabe	3
2.2	Die menschliche Existenz als Verantwortung	4
3.	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	5
3.1	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	5
3.2	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	6
4.	Die menschliche Existenz als Verantwortung	7
4.1	Die menschliche Existenz als Verantwortung	7
4.2	Die menschliche Existenz als Verantwortung	8
5.	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	9
5.1	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	9
5.2	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	10
6.	Die menschliche Existenz als Verantwortung	11
6.1	Die menschliche Existenz als Verantwortung	11
6.2	Die menschliche Existenz als Verantwortung	12
7.	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	13
7.1	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	13
7.2	Die menschliche Existenz als Gemeinschaft	14
8.	Die menschliche Existenz als Verantwortung	15
8.1	Die menschliche Existenz als Verantwortung	15
8.2	Die menschliche Existenz als Verantwortung	16

Meinen Eltern und meiner Frau
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

<u>Theoretischer Teil</u>	Seite
1. Einleitung	1
2. Verbindungen und Reaktionen des dreiwertigen Phosphors	5
2.1 Nomenklatur der organischen P^{III} -Verbindungen	5
2.2 Reaktionen von dreiwertigen Phosphorverbindungen	6
2.2.1 Nukleophile Reaktionen mit Stickstoffverbindungen	7
2.2.2 Elektrophile Reaktionen mit Stickstoffverbindungen	8
2.3 Reaktionen von P^{III} -N-Verbindungen	10
2.4 Phosphor-III-Verbindungen in der Peptidchemie	13
3. Peptidkupplungen mit P^{III} -Verbindungen	18
3.1 Mono- und Dialkyl-chlorphosphine	22
3.1.1 Synthese der Ausgangssubstanzen	22
3.1.2 Eigenschaften der Mono- und Dialkyl-chlorphosphine	24
3.1.3 Analytik	25
3.2 Reaktionen von Alkylchlorphosphinen mit Aminosäureestern	27
3.3 Reaktionen von Phosphor-III-Imiden mit N-geschützten Aminosäuren	29
3.4 Vorstellungen über den Mechanismus	35
4. Peptidkupplungen mit P^{III} -Imidazoliden	39
4.1 Peptidsynthesen mit Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen durch Aminoaktivierung	40

	Seite
4.1.1 Umsetzung von P ^{III} -Imidazoliden mit Aminosäureester-Hydrochloriden	40
4.1.2 Umsetzung von P ^{III} -Imidazoliden und Aminosäureestern mit N-geschützten Aminosäuren	43
4.2 Peptidsynthesen mit Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen durch Carboxylaktivierung	45
4.2.1 Umsetzung von P ^{III} -Imidazoliden mit N-geschützten Aminosäuren	45
4.2.2 Umsetzung von P ^{III} -Imidazoliden und Z-Aminosäuren mit Aminosäureestern	46
4.3 Vorstellungen über den Mechanismus	49
4.4 Racemisierung bei Peptidsynthesen mit P ^{III} -Imidazoliden durch Carboxylaktivierung	54
4.4.1 Racemisierungsmechanismen	54
4.4.2 Methoden zur quantitativen Erfassung der Racemisierung	56
4.4.3 Racemisierung bei der Phosphor-Imidazol-Kupplung durch Carboxylaktivierung	58
5. Anwendung der Phosphor-Imidazol-Kupplung bei der Solid-phase-Synthese von Peptiden	61
5.1 Kupplungen mit P ^{III} -Imidazoliden auf dem Harz	62
5.2 Racemisierung bei der Solid-phase-Synthese mit der Phosphor-Imidazol-Methode	66

	Verzeichnis der Abkürzungen	70
6.	Allgemeines	71
7.	Peptidsynthesen mit Alkylchlorphosphinen als Kupplungsreagentien	74
7.1	Herstellung der Ausgangssubstanzen	74
7.2	Peptidsynthesen mit Methylchlorphosphin	82
7.3	Peptidsynthesen mit Äthylchlorphosphin	84
7.4	Peptidsynthesen mit Diäthylchlorphosphin	84
8.	Peptidsynthesen mit Phosphor-III-Imidazol- Verbindungen	86
8.1	Darstellung von Vergleichssubstanzen zur Abklärung des Kupplungsmechanismus'	86
8.2	Peptidsynthesen mit Chlorphosphinen und Imidazol durch Aminoaktivierung	87
8.3	Peptidsynthesen mit Phosphor-trichlorid und Imidazol durch Carboxylaktivierung	88
8.4	Peptidsynthesen mit Äthylchlorphosphin und Imidazol durch Carboxylaktivierung	90
8.5	Peptidsynthesen mit Diäthylchlorphosphin und Imidazol durch Carboxylaktivierung	91
8.6	Peptidsynthesen mit Phosphor-trichlorid nach der Phosphorazomethode zur Abklärung der Molverhältnisse im Vergleich zur Phosphor- Imidazol-Methode	93
9.	Racemisierungsuntersuchungen bei Peptidsyn- thesen mit Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen durch Carboxylaktivierung	94

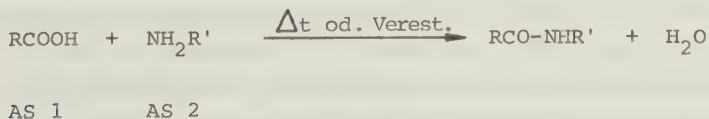
	Seite
9.1 Ausgangssubstanzen	94
9.2 Darstellung von Gly-?-Ala-L-LeuOH mit Di- äthylchlorphosphin und Imidazol durch Carboxylaktivierung	96
9.3 Darstellung von Gly-?-Ala-L-LeuOH mit Phosphortrichlorid und Imidazol durch Carboxylaktivierung	99
10. Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen als Car- boxylaktivierungsmittel bei der Festphasen- synthese von Peptiden	101
10.1 Darstellung der Aminoacylharze	101
10.2 Synthese von Dipeptiden auf dem Harz	102
10.2.1 Schema der Kupplungen	102
10.2.2 Kupplungsbedingungen	104
10.3 Racemisierung bei der Peptidsynthese mit Phosphortrichlorid und Imidazol nach der Solid-phase-Methode	107
10.3.1 Darstellung des Boc-L-Leu-Harzes	107
10.3.2 Kupplungsschema	107
10.3.3 Kupplungsbedingungen	108
Zusammenfassung	110
Literaturverzeichnis	111
Curriculum vitae	115

Theoretischer Teil

1. Einleitung

Die mit der Kupplung von einzelnen Aminosäuren oder Peptidbruchstücken zu kettenförmigen Peptiden verbundenen Probleme finden ihren Ausdruck unter anderem in der grossen Vielfalt der verwendeten Aktivierungsreagentien. Alle diese Reagentien sollten einer ganzen Reihe strenger Anforderungen genügen, um der komplexen Natur der zu knüpfenden Bindung Rechnung zu tragen. In erster Linie sind dabei die Bedingungen der Racemisierungsfreiheit der Methode, sowie der schnellen und vollständigen Kupplungsreaktion zu nennen. Weiter stellen sich die Forderungen nach problemloser Handhabung und Verfügbarkeit der Reagentien und nach einfachen Aufarbeitungsmöglichkeiten für die Reaktionsgemische. Bis jetzt hat nur die Natur die mit diesen Auflagen verbundenen Schwierigkeiten vollständig gemeistert, während den von Chemikern im Labor durchgeführten Modellkupplungen immer eine gewisse Unvollkommenheit anhaftet.

Peptide sind Ketten von Aminosäuren, die durch Amidbindungen untereinander verknüpft sind. Die Darstellung eines Peptids geschieht somit durch Acylierung der Aminogruppe einer Aminosäure AS 2 durch eine andere Aminosäure AS 1. Die Bildung einer Amidbindung aus einer freien Carboxylgruppe und einer freien Aminogruppe ist aber nur bei erhöhter Temperatur oder bei Raumtemperatur nach Verhinderung der Salzbildung zwischen RCOOH und $\text{NH}_2\text{R}'$ (z.B. durch Veresterung von RCOOH) möglich.



Für Peptidsynthesen im Labor müssen deshalb geeignete Methoden gesucht werden, die eine der beiden an der Reaktion beteiligten Gruppen in eine reaktivere Form überführen und so den Kupplungsschritt beschleunigen. Meist geschieht dies durch Einführen einer "aktiven" Gruppe -X in die Carboxylfunktion der Aminosäure AS 1, schematisch also wie folgt:

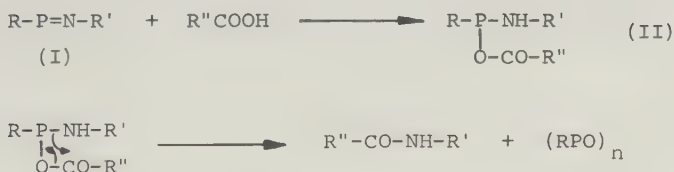


(X= Cl, R'COO, CNCH₂O, p-NO₂-Ø-O, etc.)

Ein möglichst reaktiver, d.h. ein stark elektronegativer Substituent X wäre wünschenswert im Hinblick auf eine schnelle und vollständige Acylierungsreaktion, wie sie gerade von den modernen Methoden der Peptidchemie, z.B. der Solid-phase-Synthese, verlangt wird. Dies erhöht aber die Gefahr der "Ueberaktivierung" und der damit verbundenen Nebenreaktionen (Racemisierung, Backbone-Acylierung, etc.). Gerade diese Nebenreaktionen aber sind bei der heute immer mehr an Bedeutung gewinnenden künstlichen Synthese von biologisch aktiven Peptiden, z.B. Hormonen zu medikamentösen Zwecken, ernsthafte Hindernisse: die Schwierigkeiten bei der Reinigung von länger-kettigen Peptiden sind ja hinlänglich bekannt.

Neben der Carboxylaktivierung haben sich aber auch Methoden zur "Aktivierung der Aminogruppe" bei Peptidkupplungen bewährt. Diese Methoden stützen sich hauptsächlich auf Substanzklassen mit einem "anorganischen" Zentralatom, vor allem Phosphor- oder Zinnverbindungen. Gerade Phosphorverbindungen werden in grosser Vielfalt und oft mit ansprechendem Erfolg zur Synthese von Peptiden eingesetzt. Es werden

fast ausschliesslich Verbindungen des dreiwertigen Phosphors verwendet, da hier die Bildung einer P-O-Bindung als treibende Kraft für die Kupplung ausgenützt werden kann. Bei diesen Peptidsynthesen mit P^{III} -Verbindungen als Aktivierungsmittel wird das Phosphorreagens in einer ersten Stufe mit der Aminogruppe eines Aminosäureesters umgesetzt. Dies erklärt die Einführung des Begriffs "Aminoaktivierung" für diese Art von Kupplungsmethode, obwohl das primär gebildete Phosphor-III-Imid (I) höchstwahrscheinlich in einer zweiten Stufe mit der Carboxylkomponente zu einem gemischten Anhydrid (II) reagiert (13,14) und dieses carboxylaktivierte Zwischenprodukt dann in einem letzten Schritt das Produkt liefert, schematisch wie folgt:



Die sogenannte "Aminoaktivierung" wäre demnach einfach eine indirekte Carboxylaktivierung in zwei Stufen. Der Ausdruck "Aminoaktivierung" hat sich jedoch so eingebürgert, dass er auch in der vorliegenden Arbeit für Peptidsynthesen, bei denen zuerst die Aminokomponente mit dem Aktivierungsmittel reagiert, verwendet wird.

Diese indirekte Carboxylaktivierung hat den Vorteil, dass der peptidbildende Schritt*) intramolekular erfolgen kann und somit die Geschwindigkeit der Produktbildung, besonders gegen Ende der Reaktion, nicht von der Konzentration der

*) sofern er nach obigem Schema verläuft

Edukte abhängig ist (Reaktion 1. Ordnung). Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei diesem Mechanismus vermutete man ursprünglich bei der bimolekularen Bildung des gemischten Anhydrids (II) aus dem Phosphor-III-Imid und der Säure-Komponente. Neuere Arbeiten (14) zeigen aber, dass dies höchstwahrscheinlich nicht zutrifft.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit dienen einestails der weiteren Abklärung des Kupplungsmechanismus' bei Peptidsynthesen mit Aminoaktivierung durch organische P^{III}-Verbindungen, andernteils werden Imidazolderivate derselben P^{III}-Verbindungen auf ihre Eignung als Kupplungsreagentien bei Peptidsynthesen untersucht.

2. Verbindungen und Reaktionen des dreiwertigen Phosphors

2. 1 Nomenklatur der organischen P^{III} -Verbindungen

Als Grundlage für die Benennung von organischen Phosphorverbindungen dienen in der vorliegenden Arbeit die Nomenklaturregeln wie sie in Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", Band 12, (17) festgelegt sind, da die von der I U P A C aufgestellten Richtlinien in der deutschen Sprache oft schwer anzuwenden sind. Eingebürgerte Trivialnamen, die die Struktur der beschriebenen Verbindung transparenter machen können, werden hie und da gebraucht (z.B. Diäthylchlorphosphin anstelle von Phosphinigsäurechlorid).

Phosphine werden wie die entsprechenden Amine benannt:

RPH_2	primäres Phosphin
R_2PH	sekundäres Phosphin
R_3P	tertiäres Phosphin

Die organischen Phosphorsäuren werden folgendermassen bezeichnet:

$P(OH)_3$	phosphorige,	$P(O)(OH)_3$	Phosphor-Säure
$RP(OH)_2$	phosphonige,	$RP(O)(OH)_2$	Phosphon-Säure
$R_2P(OH)$	phosphinige,	$R_2P(O)(OH)$	Phosphin-Säure

Alle andern organischen Phosphorverbindungen werden als Derivate dieser Säuren behandelt und entsprechend benannt:

$R_2P(O)Cl$	Phosphinsäure-chlorid
$RP(O)(OR')Cl$	Phosphonsäureester-chlorid
$RP(OR')_2$	Phosponigsäure-diester
$R_2PNR'_2$	Phosphinigsäure-amid
$(RPNR')_2$	Phosponigsäure-imid (dimer)

2. 2 Reaktionen von dreiwertigen Phosphorverbindungen

Phosphor-III-Verbindungen können sowohl elektrophil als auch nukleophil reagieren. Elektrophile Reaktionen werden durch die aus dem grossen Atomradius und der starken Polarisierbarkeit des Phosphoratoms resultierenden Verringerung der Abstossungskräfte auf angreifende nukleophile Substanzen ermöglicht. Die Reaktionsfähigkeit wird sehr ausgeprägt durch die Einflüsse der Substituenten am Phosphor bestimmt, wobei sowohl induktive als auch mesomere Effekte, die die Elektronendichte am Zentralatom verringern, den Angriff des Nukleophils erleichtern.

Die nukleophile Reaktivität von Phosphor-III-Verbindungen wird bestimmt durch das relativ niedrige Ionisationspotential der 3s-Elektronen und die bei der Promotion der Elektronen in ein sp^3 -Hybrid möglich werdenden, starken Bindungen im Produkt. Ausserdem können Uebergangszustände durch "back-

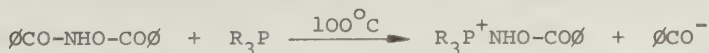
donation" von p-Elektronen des Elektrophils in die freien 3d-Orbitale des Phosphors stabilisiert werden ("Biphilie"), was bei mehr als einem zur Verfügung stehenden elektrophilen Zentrum den Reaktionsverlauf mitbestimmen kann (18). Bedingung für eine solche Stabilisierung sind stark elektro-negative Substituenten am Phosphor oder die Ausbildung eines phosphoniumartigen Zwischenprodukts.

2. 2. 1 Nukleophile Reaktionen mit Stickstoffverbindungen

Nukleophile Reaktionen von dreiwertigem Phosphor mit gesättigten Stickstoffverbindungen sind eher selten, doch können Phosphor-III-Verbindungen gute Abgangsgruppen am Stickstoffatom substituieren (19,20).



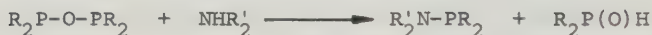
Es wird vermutet, dass die Reaktion über ein durch "back-donation" von p-Elektronen des N-atoms in die 3d-Orbitale des Phosphors stabilisiertes Zwischenprodukt verläuft. Darauf hin deutet auch die nur unter drastischen Bedingungen ablaufende Umsetzung von O,N-Dibenzoyl-hydroxylamin mit Phosphinen (21), ist doch hier eine "back-donation" der in den Amidbindungen delokalisierten p-Elektronen und damit



eine Stabilisierung des Uebergangszustandes nicht möglich.

2. 2. 2 Elektrophile Reaktionen mit Stickstoffverbindungen

Phosphor-III- Verbindungen mit guten Abgangsgruppen reagieren mit starken Nukleophilen, also auch mit nukleophilen Stickstoffverbindungen, spontan in einer S_N2 -Reaktion. Als Phosphorkomponenten werden bei diesen Umsetzungen meist P^{III} -Halogenide eingesetzt, doch können Amine z.B. auch mit Anhydriden von dreiwertigen Phosphorsäuren zu den entsprechenden P^{III} -Amiden reagieren. (33)



Werden P^{III} -Halogenide mit einem in Bezug auf die Halogenatome doppelten Ueberschuss eines sekundären Amins versetzt, so entstehen die Amide der entsprechenden Phosphor-III-Säure, während die substituierten Halogene als Hydrochlorid des betreffenden Amins ausfallen.



Gibt man weniger als den doppelten Ueberschuss an Aminokomponente zu, so werden stabile Halogenamide gebildet.

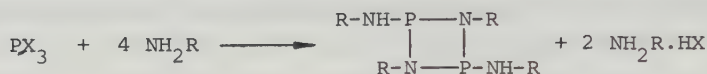


Anders liegt der Fall bei der Behandlung von P^{III} -Halogeniden mit primären Aminen in einer weniger als die doppelte Molzahl an Halogenatomen betragenden Menge, sind doch Verbindungen mit einer NH- oder OH-Gruppe sowie einer Abgangsgruppe am selben Phosphoratom instabil und reagieren unter β -Elimination weiter (22).

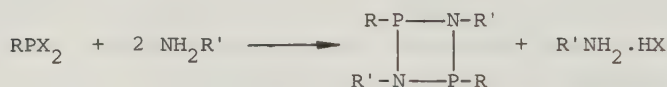


Es wird also in einer ersten Stufe aus dem Phosphorigsäurechlorid-amid HX abgespalten, worauf das so entstehende Produkt (I) eine $p\pi-p\pi$ -Doppelbindung enthält. Eine solche ist aber bei den Elementen der zweiten Periode infolge der diffusen $3p$ -Orbitale (37) und der Abstossungskräfte durch die gefüllten inneren Schalen (72) nicht stabil, weshalb (I) schematisch sofort mit einem zweiten Molekül der gleichen Art zu einem Dimeren (II) weiterreagiert. Dieser 4-Ring ist die einfachste und wahrscheinlichste Struktur von (II) (22), doch ist dieselbe nicht vollständig gesichert. Dass (II) dimer ist, wird durch Molekulargewichtsbestimmungen bestätigt (55). Die beiden noch vorhandenen Halogenatome am Phosphor im Produkt (II) können mit weiteren 2 Mol eines primären Amins rea-

gieren, was zu den seit Michaelis (23) bekannten Phosphorazoverbindungen führt. Die Reaktion von PX_3 mit 4 Mol eines primären Amins hat also schematisch folgendes Aussehen:



Aehnlich sieht das entsprechende Produkt der Reaktion zwischen einem primären Amin und einem Alkyl- oder Aryldichlorphosphin als Phosphorkomponente aus:



Fragwürdig erscheint nach dieser Theorie die Isolierung und Destillation von Phosphorigsäuredichlorid-äthylamid, $EtNHPCl_2$, durch Michaelis (24), wäre doch dieses Produkt nach neueren Erkenntnissen nicht stabil.

2. 3 Reaktionen von P^{III} -N-Verbindungen

Phosphor-Stickstoff-Verbindungen mit dreiwertigem Phosphor können bekanntlich (18) sowohl elektrophil als auch nukleophil reagieren. Dabei ist zu beachten, dass die Nukleophilie des Stickstoffs durch "back-donation" von p-Elektronen des Stickstoffatoms in die leeren 3d-Orbitale des Phosphors stark vermindert ist, so dass nukleophile Reaktionen von P^{III} -N-Verbindungen, die man am Stickstoffatom erwarten würde, in

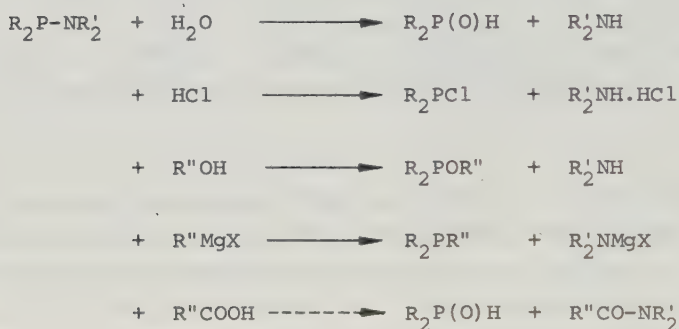
Wirklichkeit am Phosphor stattfinden. So wird z.B. bei der Reaktion von Dimethylphosphinigsäure-dimethylamid mit Methyljodid nicht der Stickstoff, sondern der Phosphor quarternisiert (73).



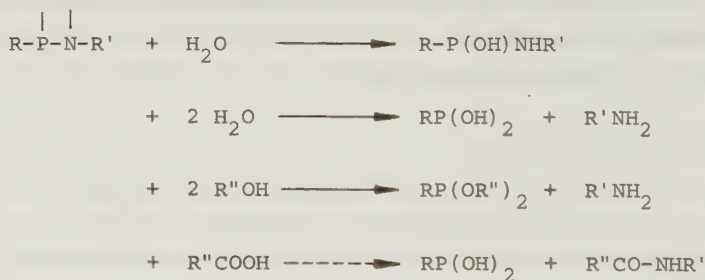
Je stärker der -I -Effekt der Substituenten am Phosphor ist, umso grösser wird die Stabilisierung des gebildeten Amids durch die durch "back-donation" ausgebildete $p\pi-d\pi$ -Bindung sein. So beschreibt Harris (25) die von $(\text{CF}_3)_2\text{PCl}$ mit NH_3 oder primären Aminen gebildeten Phosphinigsäure-amide als infolge starker $p\pi-d\pi$ -Bindung zwischen P und N extrem stabil. Umgekehrt ist die Stabilität des einzigen bis jetzt mit Sicherheit identifizierten primären Halogen-Phosphor-III-amids, von $\text{CH}_3\text{PF-NHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, wahrscheinlich auf die Donoreigenschaften des Fluors und die dadurch ermöglichte, sehr starke $p\pi-d\pi$ -Bindung zwischen diesem und Phosphor zurückzuführen, verliert doch damit das Fluor seine Eigenschaft als Abgangsgruppe (38).

Nukleophile Reagentien greifen P^{III} -N-Verbindungen am Phosphor an und spalten die P-N-Bindung, wobei der Stickstoff mit dem elektrophilen Rest des Nukleophils reagiert. Der nukleophile Angriff wird durch Protonen oder Lewissäuren katalysiert, da dadurch ein stark elektrophiles Phosphoniumion gebildet wird, das sehr leicht von nukleophilen Substanzen angegriffen wird. Ausserdem erleichtert die ebenfalls mögliche Protonierung des Stickstoffatoms die Spaltung der P-N-Bindung.

Beispiele für nukleophile Reaktionen mit P^{III} -N-Verbindungen sind die folgenden Umsetzungen (71):



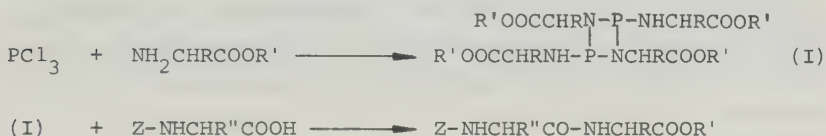
Auch Phosphorazoverbindungen können auf ähnliche Weise unter Spaltung von P-N-Bindungen mit nukleophilen Reagentien umgesetzt werden (26):



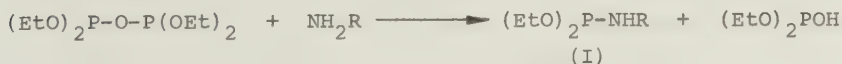
Diese Formulierungen stützen sich auf die Untersuchungen von Grimm et al. (26) an den relativ stabilen und deshalb isolierbaren Phosphorazoverbindungen mit aromatischen Aminen, die mit Wasser ohne Säurezusatz nur sehr langsam reagieren.

2. 4 Phosphor-III-Verbindungen in der Peptidchemie

Nachdem Grimmel et al. (27) erstmals festgestellt hatten, dass Phosphorazoverbindungen mit Carbonsäuren zu Amidan reagieren können, wurde die Methode schon bald auch für Peptidsynthesen verwendet. Goldschmidt et al. (28,29,30) und Süs (31) führten fast gleichzeitig Kupplungen zwischen Aminosäureestern und N-geschützten Aminosäuren mit PCl_3 durch. Die Reaktion verläuft schematisch wie folgt:

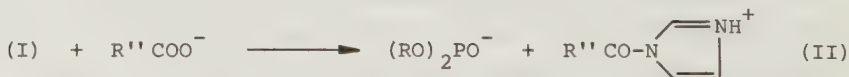


Auch bei den von Anderson et al. (32) durchgeführten Versuchen mit Diäthylchlorphosphit ist die P-N-Bindung zwischen dem Phosphorreagens und der Aminogruppe des Aminosäureesters die aktive Stelle bei der Umsetzung mit einer Säurekomponente, doch wird hier keine dimere Phosphorazoverbindung gebildet. Durch Verwendung von Tetraäthyl-pyrophosphit anstelle des Säureester-chlorids und Umsetzung desselben mit einem freien Aminosäureester anstelle des sonst üblichen Hydrochlorids, kann bei dieser Methode ein einfacheres Reaktionsgemisch ohne Chloridionen erhalten werden (33).



Goldschmidt et al. (34) sowie Anderson et al. (35) versuchten bald danach Peptidkupplungen mit Aethyldichlorphosphit. Dabei geht das zuerst gebildete Phosphit-diamid, unter Abspaltung der Estergruppe am Phosphor in Form von Alkohol, in die Phosphorazoverbindung über.

Die Phosphitmethode wurde später von Anderson (74) sowie von Mitin et al. (15, 36) weiter ausgebaut: Durch Zusatz von Imidazol werden Kupplungsreaktionen mit Tetraäthylpyrophosphit (Anderson) resp. Triphenylphosphit (Mitin) als Kupplungsreagens beträchtlich beschleunigt und liefern höhere Ausbeuten. Sowohl Anderson (74) als auch Mitin (16) vermuten, dass bei diesen Versuchen zuerst via ein Phosphonigsäureester-imidazolid das Säureimidazolid der N-geschützten Aminosäure gebildet wird und dieses als eigentliches aktives Partikel mit der Aminokomponente reagiert. Die Tatsache, dass Mitin unter 0.5% Racemisierung findet (15) (bei Anderson fehlt diese Angabe), scheint diese Vermutung zu stützen (vgl. S 49).



R = -Ø (15,36), -Et (74)

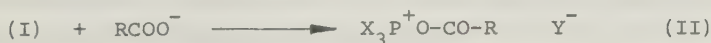
R' = -Ø (15,36), -P(OEt)₂ (74)

Ebenfalls in neuerer Zeit beschäftigten sich Brenner et al. (14) mit der herkömmlichen Phosphorazomethode nach S. Goldschmidt et al. (28,29,30). Anstelle von Phosphortrichlorid verwenden sie aber Alkyl- und Aryl-dichlorphosphine, um den Einfluss der verschiedenen Substituenten auf die Kupplungsgeschwindigkeit zu studieren. Die Resultate lassen Rückschlüsse auf den Mechanismus der Phosphorazokupplung zu.

Eine ganz neue Art der Peptidsynthese mit P^{III} -Verbindungen wurde von verschiedenen Autoren fast gleichzeitig entdeckt (39,40,75,80) und seither in diversen Varianten weiterentwickelt (41,76,77,78,81). Dabei wird in einer ersten Stufe eine P^{III} -Verbindung durch ein weiches Oxidationsmittel aktiviert.



Das Phosphoniumsalz (I) reagiert mit einer Carbonsäure zu einem Acyloxyphosphoniumsalz (II).



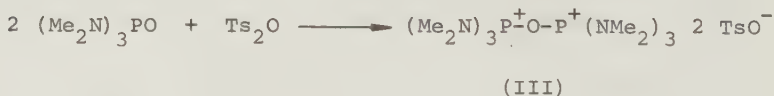
Diese Acyloxyphosphoniumsalze sind ausgezeichnete Acylierungsmittel (79) und können für Amidsynthesen eingesetzt werden, wobei drei Mechanismen denkbar sind:

1. Direkter Angriff des Aminstickstoffs auf den Carboxylkohlenstoff am Phosphor. (79)
2. Angriff des Aminstickstoffs an den Phosphor und anschließend intramolekulare Knüpfung der Amidbindung. (41,79)

3. Bildung von symmetrischem Carbonsäureanhydrid aus dem Acyloxyphosphoniumsalz, wobei das Anhydrid durch noch vorhandenes Phosphoniumsalz (I) ständig wieder nachgeliefert wird (76).

Mukaiyama et al. (39,40) verwenden Triphenylphosphin, das durch die o-Nitrophenyl-sulfenyl-Schutzgruppe (NPS) der Aminokomponente aktiviert wird, als Kupplungsreagens. Auch bei dieser Synthese tritt höchstwahrscheinlich ein Acyloxyphosphoniumsalz als reaktives Partikel auf, ebenso wie bei der Methode von Mitin und Vlasov (80), bei der Triäthylphosphit, $(\text{EtO})_3\text{P}$, durch $2,4-(\text{NO}_2)_2-\text{O}-\text{S}-\text{Bu}^t$ aktiviert wird.

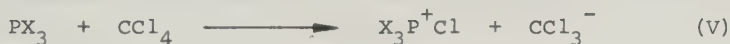
Gawne et al. (75) können das Phosphoniumsalz (I) auch durch Aktivierung einer P^{V} -Verbindung herstellen. Sie setzen Hexamethylphosphoramid, $(\text{Me}_2\text{N})_3\text{P}=\text{O}$, das gleichzeitig als Lösungsmittel fungiert, mit Tosylanhydrid um und erhalten so ein Addukt (III), das mit der Säurekomponente zum Acyloxyphosphoniumsalz (IV) reagiert.



Dieses Salz (IV) liefert mit einem Aminosäureester das Peptid in Ausbeuten von über 90% und mit einem Racemisierungsgrad von unter 1% (Young-Test (68) und Izumiya-Test (8)). Diese im Vergleich zu den beiden vorher beschriebenen Methoden kleinere Racemisierungstendenz schreiben die Autoren der relativ geringen Reaktivität des Phosphoniumsalzes (IV) zu,

das durch pπ-dπ-Ueberlappung zwischen P und N desaktiviert wird (79). Die hohe Kupplungsgeschwindigkeit und Ausbeute wäre dann eher eine Folge von intramolekularer Katalyse des peptidbildenden Schrittes als von hoher Aktivierung (79). Als Reaktionsablauf vermuten Gawne et al., wie Mukaiyama et al. (41), den Mechanismus 2 (s.S. 15).

Castro und Dormoy (76,81) sowie Wieland und Seeliger (78) verwenden CCl_4 als Aktivierungsmittel für ihre P^{III} -Verbindungen, wobei erstere Trisdimethylaminophosphin, letztere Triphenylphosphin einsetzen. Beide formulieren als erste Stufe ein Chlorphosphoniumsalz (V), das mit der Säurekomponente zum Acyloxyphosphoniumsalz reagiert.



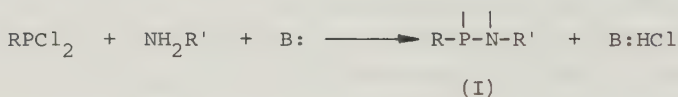
Während Wieland vermutet, dass die Kupplung nach Mechanismus 1 oder 2 (s.S. 15) verläuft, haben Castro und Dormoy (76) selbst bei -70°C eindeutig die Bildung von symmetrischem Carbonsäureanhydrid (Mechanismus 3) nachgewiesen und empfehlen ihre Methode sogar für Anhydridsynthesen. Da Wieland, wie Castro, bei seinen Kupplungen vollständig racemisierte Produkte erhält, was mit Mechanismus 3 in Einklang steht, wird auch seine Peptidsynthese über ein symmetrisches Anhydrid verlaufen.

Die unterschiedliche Racemisierung der Methoden von Gawne et al. (75) und Mukaiyama et al. (41) einerseits (95-99% L-Form) und von Wieland (78) und Castro (81) andererseits (ca. 50% L-Form) verlangen eine Ueberprüfung der vorgeschlagenen Mechanismen 2 und 3, denn nach Castro et al. sollte auch bei den erstgenannten Methoden ein symmetrisches Anhydrid auftreten.

3. Peptidkupplungen mit P^{III}-Verbindungen

Ueber den Mechanismus der Peptidkupplungen mit Aminoaktivierung (s. Definition S. 3) durch dreiwertige Phosphorverbindungen sind noch keine definitiven Aussagen möglich. Die meisten Autoren (13,14) vermuten, dass die in einer ersten Stufe gebildeten P^{III}-Imide (Phosphorazoverbindungen) (I) mit einer zugesetzten Carbonsäure zu einem Zwischenprodukt mit der Struktur eines gemischten Anhydrids (II) reagieren, das dann in einem intramolekularen Prozess das Peptid liefert.

Beispiel



Die treibende Kraft bei dieser Reaktion wäre die Bildung einer P-O-Bindung, die energetisch sehr begünstigt ist (Bildungswärme: 86 kcal/Mol für eine P-O-Bindung gegen 67 kcal/Mol für eine P-N-Bindung (42,43)).

Die Resultate unserer eigenen Versuche (Kap. 3.3) führen zwar zu modifizierten Formulierungen des Kupplungsschrittes (sie werden auf S. 35ff diskutiert), aber auch dort tritt

die aktivierte Carbonsäure immer in Form eines gemischten Anhydrids auf.

Alle bisher beschriebenen Methoden zur Aminoaktivierung mit P^{III} -Verbindungen (28,30,44) bei Peptidsynthesen verlangen relativ drastische Bedingungen zur Vergrößerung der Reaktionsgeschwindigkeit und zur Erzielung befriedigender Ausbeuten. Auch sind sie, ausser bei der Verwendung von N-Carbobenzoxy-aminosäuren, nicht racemisierungsfrei.

Damit stellt sich die Frage nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Reaktionsablauf und nach möglichen Methoden, um denselben günstig zu beeinflussen. Viele Autoren versuchten deshalb, durch die Wahl geeigneter Substituenten am P-Atom zu befriedigenderen Kupplungsergebnissen zu kommen (14, 32,34,35,36).

Wird nun der geschwindigkeitsbestimmende Schritt durch die Bildung eines gemischten Anhydrids aus dem Phosphor-III-Imid und der Aminosäure charakterisiert, so kann die Kupplungsgeschwindigkeit durch einen elektronenziehenden Substituenten R, der den nukleophilen Angriff des Carboxylations auf den Phosphor erleichtert, gesteigert werden. Gleichzeitig muss aber wahrscheinlich mit einer erhöhten Racemisierungstendenz am chiralen Zentrum der Säurekomponente gerechnet werden, da durch den vom Rest R ausgeübten induktiven Effekt die Lebensdauer des Anhydrids, das allein zu dem den Racemisierungsgrad bestimmenden Oxazolone reagieren kann, erhöht wird. Umgekehrt wird ein Substituent mit einem +I -Effekt die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamen, daneben aber auch für geringere Racemisierung sorgen. Die Versuche von Anderson et al. (32) (mit Diäthylchlorphosphit), Goldschmidt et al. (34) (mit Äthylchlorphosphit) und vor allem von

U. Giger (14) (mit p-Cyanophenyldichlorphosphin), also mit Verbindungen mit elektronenanziehenden Substituenten, zeigen aber, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt höchstwahrscheinlich nicht mit der Bildung des gemischten Anhydrids identisch ist. Vielmehr zeigt sich bei den Synthesen von Giger, dass Kupplungen mit EtPCl_2 eher schneller verlaufen als mit $\text{p-CN-}\phi\text{-PCl}_2$, jedoch trotz des +I -Effektes der Aethylgruppe, der die Lebensdauer des racemisierungsanfälligen gemischten Anhydrids verkürzt, ebenfalls zur vollständigen Racemisierung der Produkte führen.

Neben diesen elektronischen Effekten dürfen auch sterische Effekte nicht ausser Acht gelassen werden. Die räumliche Ausdehnung und Anordnung der Substituenten am Phosphor können natürlich den Reaktionsverlauf ebenfalls positiv oder negativ beeinflussen. Genaue Untersuchungen dazu existieren allerdings keine.

Ebenfalls denkbar wäre eine Beteiligung funktioneller Gruppen an den Substituenten am Reaktionsverlauf, z.B. eine intramolekulare Katalyse des peptidbildenden Schrittes durch Wasserstoffbrückenbildung mit den Protonen der Aminogruppe, wie sie von einigen Autoren bei andern Peptidsynthesen postuliert wird (79,82,83).

Diese Ueberlegungen bilden den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit. Um den Einfluss des Substituenten R am Phosphoratom auf die Kupplungsreaktion weiter zu überprüfen, werden das Methyldichlorphosphin (schwacher +I -Effekt, geringe sterische Hinderung) und das Diäthylchlorphosphin (starker +I -Effekt, grössere sterische Hinderung) dargestellt und als neue potentielle Phosphor-III-Kupplungsreagentien für Peptidsynthesen eingesetzt. Als weiterer Faktor

bei der Wahl einer dialkylsubstituierten P^{III} -Verbindung spielen die bei der Umsetzung derselben mit Aminosäureestern zu erwartenden, im Vergleich zu den entsprechenden Phosphorazoverbindungen wesentlich einfacheren, primären Reaktionsprodukte eine Rolle.

Um eindeutige Vergleiche mit den Kupplungsergebnissen von U. Giger (14) anstellen zu können, werden auch Kupplungen mit Äthylchlorphosphin, $EtP^{III}Cl_2$, durchgeführt. Dabei zeigt es sich, dass die von Giger gefundenen Resultate mit $EtP^{III}Cl_2$ aus bisher ungeklärten Gründen nicht reproduziert werden können.

3. 1 Mono- und Dialkyl-chlorphosphine

3. 1. 1 Synthese der Ausgangssubstanzen

Von den vielen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Darstellung von Chlorphosphinen sind nur wenige präparativ von Bedeutung. So führt z. B. die Behandlung von Phosphor-trichlorid mit Grignardreagens (45) auch im Unterschuss immer zu einem Gemisch von mono-, di- und trisubstituierten Produkten, die nur schwer durch fraktionierte Destillation getrennt werden können. Die Chlorierung von primären oder sekundären Phosphinen mit Chlorgas (46) oder Phosgen (47) gibt schlechte Ausbeuten und undefinierte Nebenprodukte, ebenso die Dehalogenierung von R_2PCl_4 und R_2PCl_3 durch thermische Zersetzung (48,49) oder durch Reduktion mit Metallen oder rotem Phosphor (50).

Brauchbare Methoden zur Synthese von Mono- und Dialkyl-chlorphosphinen sind:

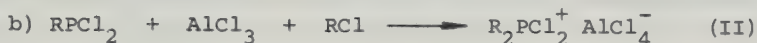
1. Alkylierung von PCl_3 mit Hilfe von Organo-quecksilber(II)-Verbindungen (51)



2. Umsetzung von Phosphorigsäurechlorid-amiden mit Grignardreagens (52)



3. Umsetzung von PCl_3 mit AlCl_3 und Alkylchloriden mit anschliessender Reduktion des gebildeten Komplexes durch Al und andere Metalle (3,4,5)



Für die letztgenannte Methode werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten der Komplexbildung wie auch der Reduktion erwähnt (3,4,5). Die in unserem Labor ausgearbeitete Vorschrift ist eine Variante dieser bekannten Synthesarten, hat aber dadurch, dass sowohl die Darstellung des Komplexes als auch die Reduktion im selben Gefäss durchgeführt werden, diesen gegenüber einige grosse Vorteile:

- Die bei tiefsiedenden Alkylchloriden notwendige Druckflaschenreaktion, die erfahrungsgemäss eine hohe Verlustquote durch Explosionen mit sich bringt, fällt weg.
- Eine Ueberhitzung des Reaktionsgemisches in der Druckflasche, was oft zu gelben Polymeren führt, ist durch die Möglichkeit der Temperaturkontrolle von aussen ausgeschlossen.

- Die Ueberführung des luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Komplexes in ein zweites Gefäss zur Reduktion erübrigt sich, da Komplexbildungsreaktion und Reduktion im gleichen Gefäss durchgeführt werden.
- Die Methode liefert beträchtlich höhere Ausbeuten.

Die Reduktion des Komplexes und die Bindung des anfallenden Aluminiumtrichlorids wird nach den bestehenden Literaturvorschriften (3,4,5) durchgeführt.

3. 1. 2 Eigenschaften der Mono- und Dialkyl-chlorphosphine

Die Chlorphosphine fallen durch ihren penetranten Geruch und ihre ausgeprägte Reaktivität gegen nukleophile Substanzen auf. Ihre Toxizität ist nicht eindeutig erwiesen, muss aber in Betracht gezogen werden. Diese Eigenschaften machen besondere Vorsichtsmassnahmen beim Umgang mit diesen Verbindungen notwendig.

Chlorphosphine sind wasserhelle Flüssigkeiten, die sich unter Stickstoffatmosphäre ohne Zersetzung destillieren lassen. Mit Wasser reagieren sie heftig zu den entsprechenden Säuren (Luftfeuchtigkeit!), wobei die phosphinigen Säuren instabil sind und zu Phosphinsäure und sekundärem Phosphin disproportionieren. Durch Sauerstoff werden sie rasch zu Phosphinsäurechloriden resp. Phosphonsäurechloriden oxidiert (s. Kap. 3. 1. 3). Bei der Behandlung mit Alkoholen gehen sie in die entsprechenden Ester über. Die Reaktion mit primären Aminen führt zu Amiden und Imiden (Phosphorazoverbin-

dungen), die ihrerseits ziemlich reaktiv sind. Mit sekundären Aminen bilden sich relativ stabile Amide. Beim Erhitzen mit Wasserstoff entstehen primäre resp. sekundäre Phosphine.

3. 1. 3 Analytik

Die grosse Affinität des Diäthylchlorphosphins zu Luftsauerstoff liess eine periodische Bestimmung des P^{III} -Gehaltes dieses Reagens' notwendig erscheinen. Die hier beschriebene Methode nützt gerade diese Affinität aus. Die Reaktionsgleichung sieht folgendermassen aus:

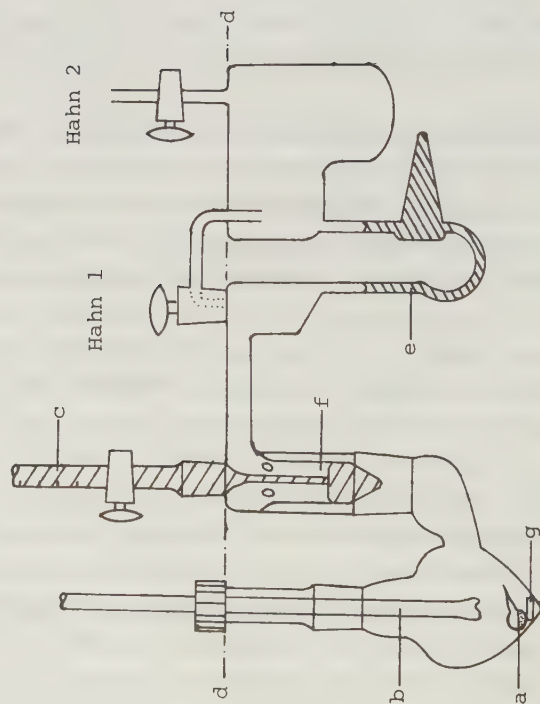


In einer trockenen, sauerstoffgefüllten Kleinhydrierapparatur nach Clauson-Kaas (84) (s. Zeichnung S. 26) werden in Glasampullen (a) eingewogene Mengen von Et_2PCl bei geschlossenen Hahnen 1 und 2 durch Zerstören der Ampulle mit dem Glasstab (b) mit dem Sauerstoff zur Reaktion gebracht und das verbrauchte Gasvolumen durch Einlassen von Quecksilber aus einer Bürette (c) bis zum Niveaueausgleich der Sperrflüssigkeit (konz. H_2SO_4) im U-Rohr bestimmt. Die ganze Apparatur ist in einem Wasserbad auf $25^{\circ}C$ thermostatisiert.

Bei einem absoluten Fehler von $\pm 2\%$ ergaben frisch unter N_2 destillierte Proben einen P^{III} -Gehalt von ca. 98%. Aeltere Proben (über 1 Monat alt) zeigten einen Anteil von 80-90%. Eine einzelne Messung dauert inklusive Temperatúrausgleich (die Reaktion ist stark exotherm) ungefähr 30 Min..

Kleinhydrierapparat nach N. Clauson-Kaas (84)

(Masstab ca. 1 : 2)



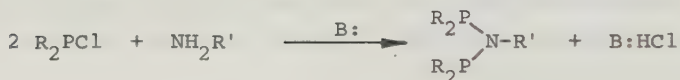
- a Glasampulle mit Et_2PCl
- b Verschiebbarer Glasstab
- c Quecksilber-Bürette
- d Niveau des Thermostabades (H_2O , 25°C)
- e U-Rohr mit Sperrflüssigkeit (konz. H_2SO_4)
- f Hg-Auffanggefäß
- g Magnetrührer

3. 2 Reaktionen von Alkylchlorphosphinen mit Aminosäureestern

Gibt man ein Chlorphosphin zu einer Aufschlammung eines Aminosäureester-Hydrochlorids in Pyridin, so werden in exothermer Reaktion die Chloratome am Phosphor durch die freien Aminogruppen des Esters substituiert, wobei sich gleichzeitig ein Niederschlag von Pyridin-Hydrochlorid bildet. Die so entstandenen Produkte, Imide oder Amide der phosphonigen resp. phosphinigen Säuren, sind sehr reaktiv und konnten noch nie in reiner Form isoliert werden. Ihre Struktur lässt sich aufgrund verschiedener Tatsachen vermuten, Beweise dafür existieren allerdings keine.

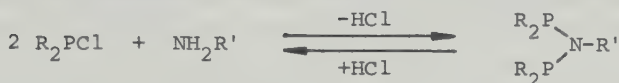
So werden nach der Reaktion von 1 Mol RPCl_2 mit 1 Mol eines Aminosäureesters in einem inerten Lösungsmittel (Benzol, CHCl_3) in Anwesenheit einer tertiären Base 2 Mol des Hydrochlorids dieser Base gefunden. Im IR-Spektrum des Reaktionsgemischs findet man keine NH-Banden bei 3300 cm^{-1} und auch keine P-Cl-Banden bei 485 cm^{-1} resp. 565 cm^{-1} mehr. Auch im NMR-Spektrum der Lösung wird kein NH-Proton mehr gefunden. Dies bedeutet, dass beide Chloratome am Phosphor durch die Aminogruppe substituiert werden. Da nun bekanntlich Phosphor keine $\text{p}\pi\text{-p}\pi$ -Doppelbindungen eingehen kann (37) (vgl. S. 9), muss das entsprechende Phosphor-imid, wie die analogen Imide mit primären Aminen (Kap. 2.2.2), in polymerer Form vorliegen. Für die Struktur dieses Polymeren wird meist eine dimerere Form mit einem P-N-Vierring angenommen (22,26). Das von S. Goldschmidt et al. (55) vorgeschlagene, offenkettige Dimerere enthält eine P-N-Doppelbindung, was seine Existenz fraglich erscheinen lässt.

Einfacher liegen die Verhältnisse bei der Reaktion von R_2PCl mit einem Aminosäureester. Da hier nur eine P-N-Bindung pro Phosphoratom möglich ist, können auch keine dimeren oder polymeren Produkte gebildet werden. Dies war ja mit ein Grund dafür, dass man sich den Dialkylchlorphosphinen zugewandt hatte (s. Kap. 3). Das Umsetzungsprodukt von 2 Mol R_2PCl mit 1 Mol Aminosäureester in Gegenwart einer tertiären Base ist wahrscheinlich einfach ein Phosphinigsäure-imid mit zwei Phosphinigsäure-Resten an einem Stickstoffatom.



Die Vermutung, dass es sich sowohl bei dieser Reaktion als auch bei derjenigen zwischen einem Alkyldichlorphosphin und einem Aminosäureester um ein Gleichgewicht handeln könnte, wurde durch den anschliessend beschriebenen Versuch weder im einen noch im andern Fall bestätigt. Nach A.B. Burg et al. (52) ist nämlich die Abspaltung der Aminogruppe in einem Phosphinigsäure- oder Phosphonigsäure-amid durch trockenes HCl-Gas möglich. Diese Tatsache würde natürlich die Einstellung eines Gleichgewichts in obenstehenden Reaktionen thermodynamisch erlauben. Zur Ueberprüfung dieses Sachverhaltes wurde von U. Giger (14) das Umsetzungsprodukt von $EtPCl_2$ mit einem Aminosäureester in Pyridin mit dem N-Carboxyanhydrid einer zweiten Aminosäure (NCA-Aminosäure = Leuchs'sches Anhydrid) versetzt. Im Falle eines Gleichgewichts müssten in der Reaktionslösung noch freie Aminogruppen vorhanden sein, die sofort mit der NCA-Aminosäure unter Freisetzung von CO_2 zu Di- und Polypeptiden reagieren würden. Derselbe Versuch wird von uns mit Et_2PCl anstelle von $EtPCl_2$ durchgeführt, aber weder U. Giger noch wir können eine CO_2 -Entwicklung mit dem am Reaktionsgefäss angeschlossenen Gasometer beobachten,

auch nicht beim Erhitzen. Ebenso verläuft die IR-spektroskopische Prüfung der Lösung auf eventuell gelöstes CO_2 (markante Bande bei 2350 cm^{-1}) negativ. Die Ausbildung eines Gleichgewichts im Sinne der Reaktionsgleichung

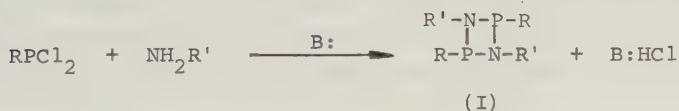


kann also verneint werden.

3. 3 Reaktionen von Phosphor-III-Imiden mit N-geschützten Aminosäuren

Versuche mit Aethyldichlorphosphin

Die Versuche von U. Giger (14) zur Peptidknüpfung mit Hilfe von Aethyldichlorphosphin über aminoaktivierte Zwischenstufen werden von uns zu Vergleichszwecken nachgearbeitet.



Ueberraschenderweise lassen sich jedoch Giger's Resultate von uns nicht reproduzieren, ergibt doch eine Kupplung von GlyOEt und Z-GlyOH mit EtPCl_2 unter genau gleichen Bedingungen wie bei Giger (in Pyridin bei ZT) nach 90 Min. Reak-

tionsdauer nur knapp über 80% Ausbeute an Z-GlyGlyOEt (zum Vergleich: U. Giger findet nach 70 Min. bei ZT 99% Dipeptid). Die relativ langsame und unvollständige Umsetzung ist schon bei der dünnschichtchromatographischen Verfolgung der Reaktion ersichtlich. Auch eine Verlängerung der Reaktionszeit bis zu 20 Std. ergibt keine wesentliche Erhöhung der Ausbeute (max. 86%).

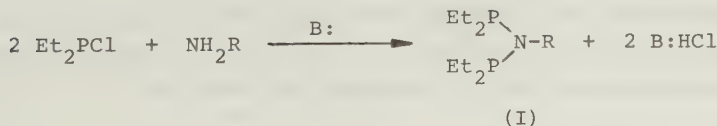
Dieses unerklärliche Verhalten wurde zunächst auf eine Verunreinigung in dem von Giger dargestellten EtPCl_2 zurückgeführt, zeigt doch sein IR-Spektrum der Substanz eine starke Absorptionsbande bei 1280 cm^{-1} , die in dem von uns hergestellten Präparat nur ganz schwach vorhanden ist (s. Spektrum S. 78). Die Vermutung, dass es sich dabei um die Absorption der oxidierten Verbindung EtP(O)Cl_2 handeln könnte (P=O-Schwingungsfrequenz liegt zwischen 1300 und 1250 cm^{-1}), wurde durch den Vergleich mit synthetisiertem EtP(O)Cl_2 vollauf bestätigt. Die Herstellung geschieht mittels Durchleiten von trockenem Sauerstoff durch eine Probe von frisch destilliertem EtPCl_2 , einer gängigen Methode zur Oxidation von reaktiven P^{III} -Verbindungen (17).

Dieses Resultat liess eine Untersuchung der Kupplungsfähigkeit der so dargestellten P^{V} -Verbindung ratsam erscheinen. Die Versuche zur Knüpfung einer Peptidbindung mit EtP(O)Cl_2 ergeben aber, dass die Bildung von Z-GlyGlyOEt nach dieser Methode nur sehr langsam und unvollständig verläuft. Auch Mischungen von EtPCl_2 und EtP(O)Cl_2 in den Verhältnissen 4:1 und 2:1 kuppeln nur langsam und mit Ausbeuten um 70%. Da im IR-Spektrum des von uns synthetisierten EtPCl_2 ein kleiner Peak bei 1280 cm^{-1} auch durch mehrmaliges Destillieren unter Stickstoff nicht wegzubringen ist, kann die im Vergleich zu Giger'schen Kupplungen schlecht verlaufende Reaktion vielleicht der Unreinheit unseres eigenen

Phosphoreagens' (Gigers IR-Spektrum von EtPCl_2 ist nicht unbedingt repräsentativ für die bei seinen Kupplungsversuchen verwendete Qualität) oder aber der unterschiedlichen Qualität des verwendeten Lösungsmittels (Pyridin, Fluka puriss.) zugeschrieben werden. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass auch U. Giger (als Gast) mit unseren Reagentien die eigenen Resultate nicht reproduzieren konnte und bei einer Modellkupplung von Z-GlyGlyOEt bei ZT nach 80 Min. nur 75% Ausbeute erhielt.

Versuche mit Diäthylchlorphosphin

Gibt man zum Umsetzungsprodukt von 1 Mol Et_2PCl mit 1 Mol eines Aminosäureesters in Pyridin 1 Mol einer N-geschützten Aminosäure, so bildet sich der N-geschützte Dipeptidester in einer langsamen und unvollständigen Reaktion. Da nun sowohl bei der klassischen Phosphorazomethode mit PCl_3 (28) wie auch bei den Versuchen mit EtPCl_2 (14) als Kupplungsreagens immer eine möglichst hohe Zahl an P-N-Bindungen pro Aminosäureester zur Erzielung rascher und vollständiger Umsetzungen mit Z-Aminosäuren nötig sind, werden auch mit Et_2PCl Reaktionen im Verhältnis von P^{III} -Verbindung zu Aminokomponente von 2 Mol zu 1 Mol durchgeführt. Dabei wird, analog zu den Kupplungen mit Et_2PCl während 15 Min. bei 0°C mit einem Aminosäureester-Hydrochlorid in Pyridin umgesetzt, eine Z-Aminosäure auf einmal zur Lösung zugegeben und bei ZT weiterreagieren gelassen.





Bei dieser Methode bildet sich der N-geschützte Dipeptidester in kurzer Zeit und guter Ausbeute. Speziell die erstaunlich hohe Kupplungsgeschwindigkeit verdient Beachtung.

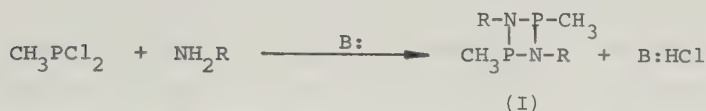
Dauert es mit PCl_3 bei ZT noch volle 20 Std. bis alles GlyOEt im Dünnschichtchromatogramm (DC) verschwunden ist, so reduziert sich diese Zeitspanne mit $EtPCl_2$ als Aktivierungsmittel auf 70 Min. bei ZT. Bei der Verwendung von Et_2PCl sind 5 Min. nach dem Start nur noch ganz geringe Spuren von GlyOEt im DC nachweisbar, und nach spätestens 15 Min. ist von den Ausgangsmaterialien im Reaktionsgemisch nichts mehr vorhanden.

Dass die Ausbeuten auch nach längeren Reaktionszeiten nie 100% betragen (90% nach 15 Min., 91% nach 20 Std.), ist eventuell auf ein Nebenprodukt zurückzuführen, das bei der Reaktion des Et_2PCl mit dem Aminosäureester entsteht und im DC sichtbar gemacht werden kann (Cl_2 /Tolidin). Die Struktur dieses Nebenprodukts konnte nicht sicher abgeklärt werden, da es beim Ausschütteln mit 2n HCl zerstört wird, doch handelt es sich aufgrund der ungewöhnlichen Stabilität gegen hydrolytische Bedingungen (DC-Platte) wahrscheinlich um ein Amid oder Imid des fünfwertigen Phosphinsäurechlorids, $Et_2P(O)Cl$.*) Dieses entsteht wahrscheinlich zum Teil durch Oxidation des Et_2PCl mit im Lösungsmittel gelöstem oder bei der Reagentienzugabe ins Reaktionsgefäß eingeschlepptem Sauerstoff, zum Teil (s. Kap. 3.1.3) ist es im zugesetzten Phosphorreagens schon von Anfang an enthalten.

*) Vgl. Kap. 4.1.1

Versuche mit Methyldichlorphosphin

Um weitere Informationen über den Einfluss des Substituenten R am Phosphor auf die Geschwindigkeit der Peptidbildung zu erhalten, werden auch Kupplungen mit CH_3PCl_2 durchgeführt. Die Umsetzung von 1 Mol dieser Verbindung mit 1 Mol Aminosäureester-Hydrochlorid in Pyridin führt, analog der Umsetzung mit EtPCl_2 , schematisch zu einem dimeren Produkt mit einem P-N-Vierring. Die Reaktion dieses Produkts mit 1 Mol einer N-geschützten Aminosäure liefert den N-geschützten Di-peptidester in guter Ausbeute.



Die Kupplungsgeschwindigkeit bei Peptidsynthesen mit CH_3PCl_2 ist höher als mit PCl_3 , aber geringer als mit EtPCl_2 und Et_2PCl als Aktivierungsmittel (s. Tab. S. 34). Die zunehmende Reaktivität in der Reihenfolge $\text{PCl}_3 < \text{MePCl}_2 < \text{EtPCl}_2 < \text{Et}_2\text{PCl}$ ist möglicherweise ein Indiz dafür, dass ein starker +I-Effekt der Reste am Phosphor die Kupplungsreaktion beschleunigt. Aber auch sterische Effekte der Substituenten können einen Einfluss auf die Kupplungsgeschwindigkeit haben, indem das eine oder andere Zwischenprodukt bevorzugt gebildet wird (s. Kap. 3.4), oder der peptidbildende Schritt durch die Abstossungskräfte voluminöser Reste auf an den Phosphor gebundene Amin- oder Carbonsäuremoleküle beschleunigt wird.

Peptidkupplungen von 1 Mol Aminosäureester mit 1 Mol
Z-Aminosäure in Pyridin bei ZT

Dipeptid	Chlor- phosphin	Phosphin Mol	Zeit Std.	Rohaus- beute ¹⁾
Z-GlyGlyOEt	CH_3PCl_2	1	4	83%
Z-L-ValGlyOEt	"	1	5	73%
Z-L-Val-L-ValOMe	"	1	20	85% ²⁾
Z-GlyGlyOEt	EtPCl_2	1	1,5	82%
"	"	1	20	86%
Z-L-Val-L-ValOMe	"	1	22	91% ²⁾
Z-GlyGlyOEt	Et_2PCl	1	20	70%
"	"	2	0,25	90%
"	"	2	20	91%

1) Mittelwerte aus 2 - 4 Versuchen.

2) Die Synthesen von Z-L-Val-L-ValOMe werden mit 1,5 Mol
Z-L-ValOH pro Mol aktiviertem L-ValOMe durchgeführt.

3. 4 Vorstellungen über den Mechanismus

Das Anhydrid (V) wäre dann verantwortlich für die Tatsache, dass bei Kupplungen mit nur 1 Mol Et_2PCl pro Mol Aminosäure-ester mit 1 Mol Z-Aminosäure trotzdem Ausbeuten von über 50% Dipeptid erhalten werden, könnte es doch mit nicht umgesetzter Aminokomponente wieder zu einem aktivierten P^{III} -Amid (IV) reagieren (33), das durch freie Carbonsäure acyliert würde.



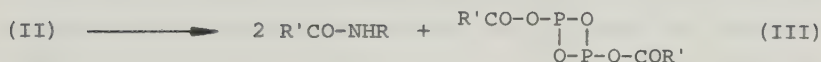
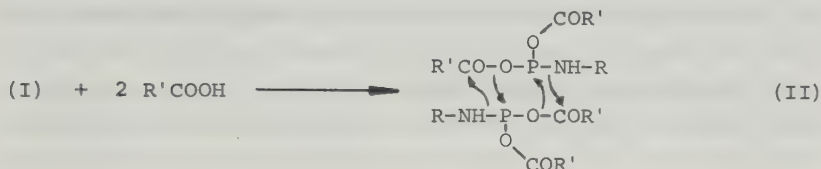
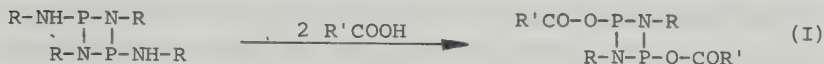
Denkbar wäre auch eine bimolekulare Reaktion von 2 Mol des gemischten Anhydrids (III) zu je 1 Mol Phosphinigsäure-anhydrid (V) und symmetrischem Carbonsäure-anhydrid, das dann mit der Aminokomponente zum Amid reagieren könnte. Die Bildung von Phosphinigsäure-anhydrid (V), das unreaktierte Aminogruppen aktivieren kann (s. oben), würde auch hier erklären, warum über 50% Dipeptid entstehen.

Uebertragen auf Kupplungen mit Phosphonig-imiden nach Giger (14), hätte der weiter oben formulierte, bimolekulare Mechanismus folgendes Aussehen:



Auch auf die klassischen Phosphorazokupplungen mit PCl_3 als Aktivierungsmittel kann man diesen Mechanismus anwenden. Dabei würden je 50% des Amids auf zwei verschiedene Arten entstehen, wobei als reaktives Partikel jedoch immer ein

gemischtes Phosphorigsäure-Carbonsäure-anhydrid fungiert.



Auffälligstes Merkmal dieses modifizierten Mechanismus' ist die bimolekulare Bildung des Peptids, nachdem ältere Theorien (13,14) eine intramolekulare Reaktion zwischen Amino- und Carboxylgruppe vermuteten. Die anfallenden P^{III} -Säuren enthalten nach unserer Theorie keine P-O-Doppelbindungen, sondern liegen in Form polymerer Anhydride vor, die hier schematisch als Dimere gezeichnet sind, obwohl auch Sechsringe oder Polymerenketten denkbar sind.

4. Peptidkupplungen mit P^{III}-Imidazoliden

Bei der Umsetzung von Phosphor-III-Chloriden mit Imidazol in verschiedenen Lösungsmitteln ist eine exotherme Reaktion feststellbar, wobei sich in unpolarem Milieu (Dioxan, CHCl₃) ein weisser Niederschlag von Imidazol-Hydrochlorid bildet, z.B. nach der Gleichung



Das P^{III}-Säureimidazolid (I) ist sehr reaktiv und wurde nie in analysenreiner Form isoliert, doch kann auf seine Existenz aufgrund fast quantitativer Ausbeuten an isolierbarem Imidazol-Hydrochlorid geschlossen werden. Lässt man die Reaktion in Dioxan ablaufen, so findet man bei der Chloridtitration der wässrigen Lösung des abgetrennten Hydrochlorids mit Silbernitratlösung 90% der theoretischen Menge.

Aufgrund der ausgeprägten Reaktivität der Phosphor-III-Säureimidazole (74,86) sowie der Ergebnisse von Mitin et al. (15,16,36) und von G.W. Anderson (74) werden Modellkupplungen mit diesen Verbindungen durchgeführt. Y.V. Mitin und seine Mitarbeiter führten Kupplungen mit Phosphiten und Chlorphosphiten erstmals in Gegenwart von Imidazol als Base durch. Dabei fanden sie eine bemerkenswerte Beschleunigung der Kupplungsreaktion verglichen mit Kupplungen in Gegenwart anderer tertiärer Basen (32,34,35). Mitin vermutet dabei einen Reaktionsverlauf mit einem Aminosäureimidazolid als reaktiver Zwischenstufe (16) (s.S. 14). Die Racemisierungsfrei-

heit seiner Synthese scheint diese Vermutung zu bestätigen, sind doch Kupplungen mit Carbonylbisimidazol (CBI), die über ein Imidazolid verlaufen (57), praktisch racemisierungsfrei (85).

G.W. Anderson (74) setzte Tetraäthylpyrophosphit und Äthylenchlorphosphit mit Imidazol um und führte mit diesen Reagentien Peptidkupplungen durch, die so höhere Ausbeuten als mit den Phosphorsubstanzen allein lieferten.

Bei den von uns durchgeführten Modellkupplungen wird einfachheitshalber das Imidazol-Hydrochlorid nicht von der Reaktionslösung abgetrennt, da eine vollständige Abtrennung nicht möglich ist und ausserdem ein Ueberschuss an Imidazol katalytisch wirken kann. Als Lösungsmittel dient ausschliesslich Acetonitril, worin das P^{III} -Imidazolid wie auch das Imidazol-Hydrochlorid löslich sind.

4. 1 Peptidsynthesen mit Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen durch Aminoaktivierung

4. 1. 1 Umsetzung von P^{III} -Imidazoliden mit Aminosäure-ester-Hydrochloriden

Wird das Reaktionsprodukt aus der Umsetzung eines P^{III} -Chlorids mit überschüssigem Imidazol in Acetonitril mit einem Aminosäureester-Hydrochlorid versetzt, so fällt nach kurzer Zeit ein flockiger Niederschlag von Imidazol-Hydrochlorid aus. Dabei wird, wie schon bei der Aminoaktivierung durch Chlorphosphine (s. Kap. 3.3), während der Reaktion des Aminosäureesters mit der P^{III} -Imidazol-Komponente innert

15 Min. jeweils ein Nebenprodukt gebildet, das dünnschicht-chromatographisch sichtbar gemacht werden kann (Cl_2 /Tolidin). Es entstehen, je nach Molzahl und Struktur der eingesetzten P^{III} -Verbindung, unterschiedliche Quantitäten unbekannter Substanzen.

Eine stete Zunahme der Menge an so gebildeten Nebenprodukten stellt man in der Reihe $0,5 \text{ Mol } \text{PCl}_3 < 1 \text{ Mol } \text{EtPCl}_2 < 1 \text{ Mol } \text{Et}_2\text{PCl} < 2 \text{ Mol } \text{Et}_2\text{PCl}$ pro Mol $\text{GlyOEt} \cdot \text{HCl}$ fest. Findet man bei der Umsetzung von $\text{P}(\text{Im})_3$ mit GlyOEt nach 15 Min. noch ein relativ sauberes Produkt, bei dem im DC praktisch nur Imidazol und GlyOEt nachgewiesen werden können, so wird bei der gleichen Reaktion mit $\text{EtP}(\text{Im})_2$ schon deutlich eine neue, nicht identifizierte Substanz A als Fleck im DC sichtbar. Noch grössere Anteile eines ähnlichen Nebenproduktes B werden mit Et_2PIm gebildet, wobei parallel durchgeführte Versuche mit 1 Mol und 2 Mol Et_2PIm pro Mol GlyOEt zeigen, dass nach 15 Min. Reaktionsdauer beim Versuch mit 2 Mol Phosphor-Imidazolid die Konzentration an GlyOEt wesentlich stärker abgenommen und diejenige an Nebenprodukt B mehr zugenommen hat als im Versuch mit 1 Mol Et_2PIm .

Diese neugebildeten Substanzen sind ausserordentlich stabil, widerstehen sie doch den hydrolytischen Bedingungen auf der DC-Platte. Auch mit zugesetzter Z-Aminosäure reagieren sie nicht oder nur sehr langsam, denn eine Abnahme der entsprechenden, Cl_2 /Tolidin-positiven Flecken im DC ist auch nach 20-stündiger Kupplungsdauer nicht feststellbar.

Diese aussergewöhnliche Stabilität lässt sich unter der Annahme teilweiser Oxidation von P^{III} zu P^{V} erklären, sind doch P^{III} -N-Verbindungen sehr leicht oxidierbare Substanzen. Die zunehmenden Mengen an gebildeten Nebenprodukten von PCl_3

zu Et_2PCl scheinen diese Vermutung zu bestätigen, nimmt doch die Affinität dieser Verbindungen zu Sauerstoff in der gleichen Reihenfolge zu.

Zur genaueren Abklärung wurde die Verbindung $\text{Et}_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$ durch Umsetzung von Et_2PCl mit trockenem Sauerstoff dargestellt und in Acetonitril mit GlyOEt umgesetzt. Tatsächlich zeigte nun die so synthetisierte Vergleichssubstanz, $\text{Et}_2\text{P}(\text{O})\text{GlyOEt}$, im DC mit verschiedenen Fließmitteln (R_f ca. 0.65 in CHCl_3 : MeOH 9 : 1, R_f ca. 0.50 in CHCl_3 : Aceton 8 : 2) immer den gleichen R_f -Wert wie das entsprechende Nebenprodukt B aus der Umsetzung von Et_2PIm mit GlyOEt . Sowohl die Modellverbindung als auch dieses Nebenprodukt werden beim Ausschütteln mit 2n HCl hydrolysiert, denn weder im Waschwasser noch im Neutralkörper lassen sie sich nachher noch nachweisen.

Diese Resultate stützen die Vermutung, dass die bei der Reaktion eines Aminosäureesters mit einem P^{III} -Chlorid-Imidazol-Gemisch auftretenden, stabilen Nebenprodukte Verbindungen mit fünfwertigem Phosphor sind. Offensichtlich reagieren die P^{III} -Verbindungen (Chloride, Amide), je nach Reaktivität, zum Teil mit im Lösungsmittel gelöstem und auch bei der Reagenzienzugabe (GlyOEt.HCl) eingeführtem Luftsauerstoff, aber auch die Ausgangssubstanzen (P^{III} -Chloride) enthalten schon unterschiedliche Anteile an oxidiertem Verbindung (s. z.B. Kap. 3.1.3). Die Bildung der stabilen P^{V} -Amide dürfte durch ImH katalysiert werden, findet man doch in Abwesenheit von ImH geringere Anteile dieser Nebenprodukte (s. Kap. 3.3).

4. 1. 2 Umsetzungen von P^{III}-Imidazoliden und Aminosäureestern mit N-geschützten Aminosäuren

Gibt man zum Umsetzungsprodukt eines P^{III}-Imidazolid mit einem Aminosäureester-Hydrochlorid in CH₃CN in Anwesenheit eines Ueberschusses an Imidazol eine N-geschützte Aminosäure, so bildet sich bei ZT innerhalb weniger Stunden der N-geschützte Dipeptidester in guter Ausbeute (70-80%). Die Reaktionsgeschwindigkeit nach DC (Verschwinden der Aminokomponente) ist ähnlich derjenigen bei einer normalen Kupplung in Pyridin durch Aminoaktivierung mit dem entsprechenden Chlorphosphin (s. Kap. 3). Es ist anzunehmen, dass der Aminosäureester in einer S_N2-Reaktion einfach das Imidazol am Phosphor ersetzt, wie das bei der Reaktion mit andern Aminen der Fall ist (86), und das so gebildete P^{III}-Amid resp. -Imid anschliessend mit der Säurekomponente, wie in Kap. 3.4 beschrieben, via ein gemischtes Anhydrid weiterreagiert, wobei das Imidazol die Funktion des Pyridins als Base bei der klassischen Kupplung durch Aminoaktivierung mit P^{III}-Chloriden übernimmt.



(I)



(II)



Die Methode hat den grossen Nachteil, dass die bei der Reaktion des Aminosäureesters mit fünfwertigen Phosphorverbindungen entstehenden P^V -Amide sehr stabil sind (s. Kap. 4.1.1) und deshalb nicht mit der Säurekomponente zum Peptid reagieren. Das zeigt sich auch daran, dass die Ausbeuten auch bei Verlängerung der Reaktionszeit nicht wesentlich grösser werden. Tatsächlich sieht man aus der Tabelle, dass nie Ausbeuten von über 80% erreicht wurden. Bei Verwendung von Et_2PCl als Phosphorkomponente, das ja weitaus am meisten Nebenprodukt liefert, liegt sie sogar nur bei 55%.

Peptidsynthesen mit P^{III} -Imidazoliden durch Aminoaktivierung bei ZT in Acetonitril (Einzelversuche)

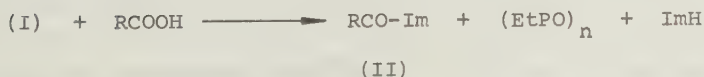
Dipeptid	Chlorphosphin	Phosphin Mol	Zeit Std.	Rohausbeute
Z-GlyGlyOEt	$EtPCl_2$	1	4	79%
"	"	1	20	80%
Z-L-Val-L-ValOMe	"	1	20	wenig
Z-GlyGlyOEt	Et_2PCl	1	55	wenig
"	"	2	1,5	55%

4. 2 Peptidsynthesen mit Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen durch Carboxylaktivierung

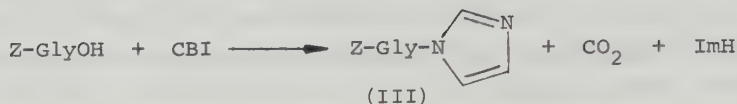
4. 2. 1 Umsetzung von P^{III}-Imidazoliden mit N-geschützten Aminosäuren

Nach den Peptidsynthesen von Mitin (15,16) und Anderson (74) mit Phosphiten und Imidazol, die über ein Carbonsäure-imidazolid verlaufen sollen, lag es nahe, unsere P^{III}-Imidazole auch für Kupplungen mit Carboxylaktivierung einzusetzen. Das primär gebildete Umsetzungsprodukt der Carboxylkomponente mit dem P^{III}-Imidazolid wird in einem Einzelversuch überprüft:

Fügt man zum Produkt aus der Reaktion eines P^{III}-Chlorids mit Imidazol in Acetonitril eine N-geschützte Aminosäure oder ein N-geschütztes Peptid, so beobachtet man eine exotherme Reaktion, bei der ein hochreaktives Partikel von nicht gesicherter Struktur gebildet wird. Die Vermutung, dass es sich dabei um das Imidazolid der betreffenden Säurekomponente handelt, wird beim Vergleich des Produktes aus der Reaktion von EtP₂Cl₂ und Imidazol mit Z-GlyOH in CHCl₃ mit durch Umsetzung von Z-GlyOH mit Carbonylbisimidazol (CBI) in CHCl₃ dargestelltem Z-Gly-Imidazolid mit grosser Wahrscheinlichkeit bestätigt.



Die entsprechende Reaktion mit CBI hat folgendes Aussehen:

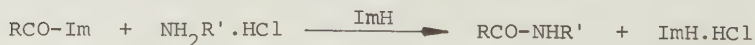


Wenn man das Reaktionsgemisch rasch mit H_2O ausschüttelt und die Chloroformlösung gleich anschliessend über Na_2SO_4 trocknet, so kann das Imidazolid in Lösung relativ rein erhalten und im DC (Cl_2 /Tolidin-positiver Fleck mit R_f ca. 0,8 in CHCl_3 : MeOH 2:1) sowie IR-spektroskopisch (markante Carboxylbande bei 1760 cm^{-1}) identifiziert werden.

Der Vergleich dieser Daten der beiden Produkte (II) und (III) bestätigt, dass dieselben wahrscheinlich identisch sind und somit bei der Umsetzung von Carbonsäuren mit P^{III} -Imidazoliden tatsächlich ein Carbonsäure-Imidazolid gebildet wird.

4. 2. 2 Umsetzung von P^{III} -Imidazoliden und Z-Aminosäuren mit Aminosäureestern

Lässt man ein Aminosäureester-Hydrochlorid mit dem Produkt der Umsetzung eines P^{III} -Imidazolids mit einer Z-Aminosäure in Anwesenheit eines Imidazolüberschusses in CH_3CN reagieren, so bildet sich der N-geschützte Dipeptidester innerhalb einer Stunde in fast quantitativer Ausbeute. Es kuppelt so schnell wie mit CBI (85), ist doch bei der Synthese von Z-GlyGlyOEt nach 5 Min. im DC praktisch kein GlyOEt mehr nachweisbar.



Bei dieser Reaktion treten fast keine Nebenprodukte auf, und nach der normalen Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erhält man das Produkt in Form farbloser Kristalle, die ohne Umkristallisation beim Literaturwert scharf schmelzen.

Von besonderem Interesse sind bei diesen Kupplungen die Molverhältnisse der Reaktionspartner, geben doch oft schon geringe Abweichungen von den Idealbedingungen stark verminderte Reaktionsgeschwindigkeiten und Ausbeuten. Es zeigt sich, dass bei allen drei geprüften P^{III} -Verbindungen die optimalen Bedingungen bei einem Verhältnis von Z-Aminosäure zu Chlor- resp. Imidazol-reste am Phosphor von 1 : 2 erreicht sind. So liefert PCl_3 als Phosphorkomponente die besten Resultate bezüglich Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute bei einem Mol-Verhältnis von Phosphortrichlorid zu Z-Aminosäure von 0,67 : 1, für $EtPCl_2$ lautet das entsprechende Verhältnis 1 : 1, und von Et_2PCl sind jeweils 2 Mol pro Mol Säurekomponente für eine rasche und vollständige Kupplungsreaktion notwendig.

Während für die Chlorphosphine diese Mol-Verhältnisse mit denjenigen bei den klassischen Kupplungen durch Aminoaktivierung (s. Kap. 3) übereinstimmen, findet man bei PCl_3 ein abweichendes Verhalten (0,5 Mol bei der Phosphorazomethode nach Goldschmidt (28), 0,67 Mol bei der Phosphor-Imidazol-Methode pro Mol Aminosäure). Eine Überprüfung der Mol-Verhältnisse bei der Phosphorazokupplung durch parallele Versuche mit 0,33, 0,5 und 0,67 Mol PCl_3 auf ein Mol Aminosäureester bestätigt den von S. Goldschmidt et al. (28) gefundenen Wert von 0,5 Mol als Optimum bei dieser Methode. Die Phosphor-Imidazol-Kupplung scheint also tatsächlich nach einem eigenen Mechanismus abzulaufen und ist nicht nur als "verschleierte" Phosphorazokupplung zu betrachten.

Peptidsynthesen durch Kupplung der Umsetzungsprodukte von P^{III} -Imidazoliden und 1 Mol Z-Aminosäure mit 1 Mol Aminosäureester-Hydrochlorid in Acetonitril bei ZT

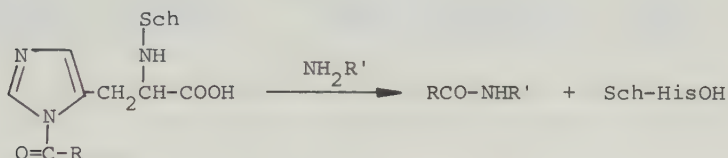
Dipeptid	Chlorphosphin	Phosphin Mol	Zeit Std.	Rohausbeute ^{a)}
Z-GlyGlyOEt	PCl_3	0,33	4	72%
"	"	0,5	4	95%
"	"	0,67	1	98%
"	"	1	3	78%
Z-L-Val-L-ValOMe	"	0,67	4	93% ^{b)}
"	"	0,67	4	64%
Z-GlyGlyOEt	$EtPCl_2$	0,5	4	83%
"	"	1	1	96%
"	"	1,5	3	84%
Z-L-Val-L-ValOMe	"	1	18	80%
Z-GlyGlyOEt	Et_2PCl	1	18	82%
"	"	2	2	98%
"	"	3	1	96%
Z-L-Val-L-ValOMe	"	2	4	92% ^{b)}
"	"	2	4	80%

a) Mittelwerte aus 2-3 Versuchen

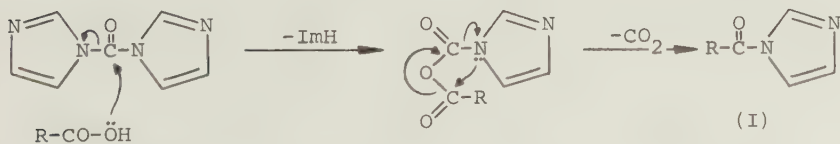
b) Mit 1,5 Mol L-ValOMe pro Mol Z-L-ValOH

4. 3 Vorstellungen über den Mechanismus

Schon relativ früh wurde die Eignung von Imidazolderivaten als potentielle Kupplungsreagentien für Peptidsynthesen erkannt. Bergmann et al.(88) und später Wieland et al.(58) fanden, dass am Imidazolstickstoff acyliertes, NH_2 -geschütztes Histidin mit Aminen Amide und NH_2 -geschütztes Histidin liefert.

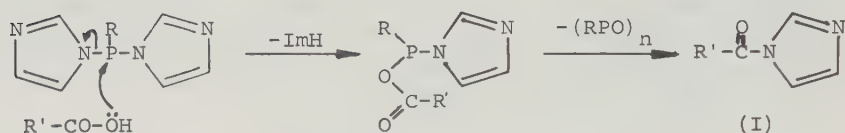


Da sich Histidin als Acyl-Aktivator bei Laborversuchen als ungeeignet erwies, wurden andere Imidazolverbindungen als aktivierende Substituenten gesucht. Am bequemsten ist Imidazol selbst, das sich via N,N'-Carbonylbisimidazol (CBI) auf RCOOH übertragen lässt. RCOIm liefert praktisch racemisierungsfrei *) hohe Ausbeuten bei Kondensationsreaktionen mit Aminosäureestern (57). Das Säureimidazolid (N-Acyl-Imidazol) wird über ein intermediäres Carbaminsäure-Carbonsäure-Anhydrid gebildet. Die Reaktion wird durch die Entropieerhöhung infolge Freisetzung von CO_2 begünstigt.

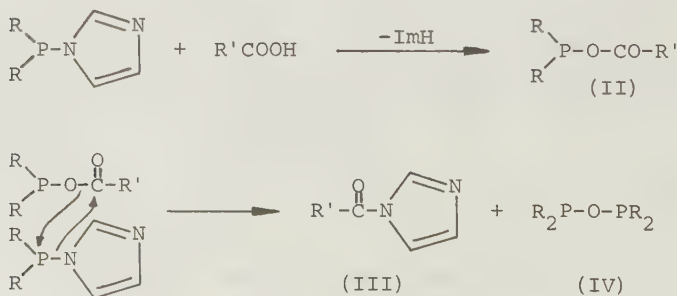


*) weniger als 0.5% Racemisierung in DMF (Anderson-Test) (85)

Auch bei den Phosphor-Imidazol-Kupplungen mit Carboxylaktivierung (Kap. 4.2.1) ist von uns die Bildung eines Säureimidazolid (I) mit grosser Wahrscheinlichkeit nachgewiesen worden. Bei dieser Umsetzung kann die Entstehung einer P-O-Bindung als treibende Kraft für die Bildung von (I) angesehen werden. Am Beispiel von R_2PCl_2 kann man die Reaktion wie folgt formulieren:



Als Alternative kommt aber auch ein bimolekularer Mechanismus nach den auf S. 35 ff aufgestellten Formulierungen in Betracht, der sich auf alle drei getesteten P^{III} -Verbindungen anwenden lässt und auch erklärt, warum immer zwei Imidazolreste pro Aminosäure für eine schnelle und vollständige Kupplungsreaktion notwendig sind. Das in einer ersten Stufe gebildete, gemischte P^{III} -Säure-Carbonsäure-Anhydrid (II) würde demnach mit einem zweiten P^{III} -Säure-Imidazolid zum Carbonsäure-Imidazolid (III) und dem symmetrischen P^{III} -Säure-Anhydrid (IV) reagieren, z.B. wie folgt:



Das Auftreten von Phosphinigsäure-Anhydrid (IV) könnte erklären, warum bei der Verwendung von nur 1 Mol Diäthylphosphor-Reagens pro Mol Aminosäure trotzdem weit über 50% Ausbeute an Peptid gefunden werden, dürfte doch dieses Anhydrid mit überschüssigem Imidazol zum P^{III} -Imidazolid reagieren und den oben beschriebenen Zyklus wieder von vorne starten.

Entsprechend kann man auch für Kupplungen mit $EtP(Im)_2$ und PIm_3 einen bimolekularen Mechanismus nach Kap. 3.4 für die Bildung des Carbonsäure-imidazolids postulieren.

Die in jedem Fall auftretenden Zwischenprodukte mit der Struktur von N-Acyl-Imidazol sind sehr reaktive Substanzen, die sich schon mit Luftfeuchtigkeit, schneller aber unter Einwirkung von Alkali, zersetzen (58). Die Instabilität der Imidazolide ist durch das Fehlen der bei andern Amiden üblichen Resonanzstabilisierung durch Abgabe der freien Elektronen des Stickstoffs in die Amidbindung bedingt, wird doch dieses Elektronenpaar für die Stabilisierung des aromatischen Imidazolrings gebraucht (87). Das reaktive Partikel bei der Umsetzung des Imidazolids mit einem Nukleophil ist, auch bei neutralem pH, das Acylimidazolium-Kation (V) (87). Obwohl es bei pH 7 nur zu einem geringen Prozentsatz vorliegt, ist seine Reaktivität so gross, dass die Reaktion mit dem Acylimidazolid daneben vernachlässigt werden kann. Die Umsetzung mit einem Amin verläuft also nach folgendem Schema:



Die Uebertragung der Acylgruppe aus (V) auf ein angreifendes

Nukleophil wird durch Imidazol katalysiert (87,89). Die kinetischen Untersuchungen lassen auf einen allgemein basenkatalysierten Mechanismus (general base catalysis) schliessen (90). Dieses Resultat erklärt die Notwendigkeit eines Ueberschusses an Imidazol bei den von uns durchgeführten Kupplungen.

Andere mögliche Kupplungsmechanismen

Ausser dem hier beschriebenen Mechanismus, der das intermediäre Auftreten eines Carbonsäure-imidazolids beinhaltet, sind auch Reaktionsabläufe ohne dieses Zwischenprodukt denkbar. Obwohl unser Charakterisierungsversuch und die Epimerisierungstests (Kap. 4.4), die, im Gegensatz zu den klassischen Kupplungen von Giger (14) und Goldschmidt (60) mit Aminoaktivierung, nur sehr wenig (um 5%) Epimerisierung ergeben, auf das Auftreten dieses Zwischenprodukts hinweisen, wurden doch Sondierungsversuche in andern Richtungen durchgeführt; sie verliefen jedoch alle negativ:

Lässt man EtPCl_2 mit der entsprechenden Menge Pyridin anstelle von Imidazol in Acetonitril reagieren und gibt dann eine Z-Aminosäure zu, so kann keine Reaktion beobachtet werden (keine Wärmetönung). Der anschliessende Versuch einer Kupplung mit einem Aminosäureester verläuft negativ: im DC zeigen sich auch nach mehreren Stunden nur Spuren von Dipeptid. Dadurch wird die Bildung eines gemischten Phosphonigsäure-Aminosäure-Anhydrids ausgeschlossen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der intermediären Bildung eines symmetrischen Z-Aminosäure-Anhydrids. Zu deren Ueberprüfung wird das symmetrische Z-Gly-Anhydrid, $(\text{Z-Gly})_2\text{O}$, durch Umsetzung von Z-GlyOH mit DCCI hergestellt (6) und

durch Ausschütteln und Umkristallisieren gereinigt. Bei der anschliessenden Reaktion von 1 Mol $(Z\text{-Gly})_2\text{O}$ mit 1 Mol GlyOEt in Acetonitril bildet sich in wenigen Minuten der Z-Dipeptid-ester in 99%-iger Ausbeute. Es scheint jedoch sehr fraglich, ob die bei der Kupplung freiwerdende Z-Aminosäure bei ihrer rasch abnehmenden Konzentration durch die Phosphorverbindung schnell genug wieder in die Anhydridform überführt werden könnte, um die bei der Phosphor-Imidazol-Methode beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit zu erklären.

Die ebenfalls mögliche Bildung eines Z-Aminosäure-chlorids wird ausgeschlossen aufgrund eines Versuchs, bei dem Z-GlyOH mit EtPCl_2 und Et_2PCl in Acetonitril während 2 Std. auf 60°C erhitzt wird, ohne dass Benzylchlorid, das als Tränengas leicht nachweisbar ist, gebildet wird, wie das bei Z-Gly-Cl schon bei ZT der Fall ist.

4. 4 Racemisierung bei Peptidsynthesen mit P^{III} -Imidazoliden durch Carboxylaktivierung

Aminosäuren sind optisch aktive Substanzen, d.h. sie haben, mit Ausnahme von Glycin, mindestens ein asymmetrisches Zentrum. Da in der Natur alle Peptide und Proteine aus Aminosäuren in der L-Form aufgebaut sind, muss der Stereochemie bei der künstlichen Synthese von Peptidketten besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Eine Kupplungsmethode ist also nur dann von praktischem Nutzen, wenn die chiralen Zentren zu einem sehr hohen Prozentsatz intakt bleiben.

4. 4. 1 Racemisierungsmechanismen

Der Begriff "Racemisierung" beinhaltet genau genommen den Verlust der sterischen Einheitlichkeit aller chiralen Zentren eines vorgebildeten Moleküls mit mehreren solchen Zentren. Bei Peptidkupplungen, bei denen nur das $C\alpha$ der Carboxylkomponente racemisierungsanfällig ist, wäre die Bezeichnung "Epimerisierung" richtiger, konnte sich aber nie durchsetzen. Deshalb wird auch in dieser Arbeit der eingebürgerte Begriff "Racemisierung" verwendet.

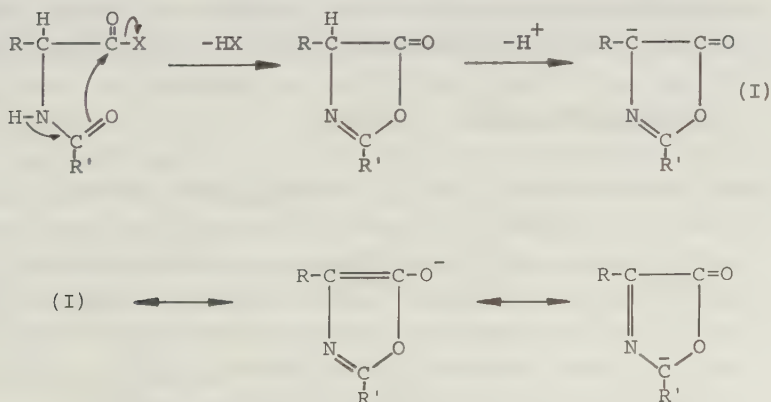
Zwei Mechanismen werden hauptsächlich für die Racemisierung bei Peptidsynthesen verantwortlich gemacht:

1. Direkte Ionisierung am $C\alpha$ durch Deprotonierung.
2. Oxazolombildung von N-Acylaminosäuren mit anschliessender Bildung eines mesomeriestabilisierten Carbanions am $C\alpha$.

Die direkte Ionisierung am $C\alpha$ wird durch jede im Reaktionsgemisch befindliche Base gefördert. Je stärker die Base, umsomehr sterisch uneinheitliches Produkt wird gebildet werden.

Young et al. (61) haben in neuerer Zeit gezeigt, dass Chloridionen in aprotischen Lösungsmitteln stark basisch sein können und entsprechend die Deprotonierung des C α fördern. Sie machen allerdings nicht allein die Basizität des Chloridions, sondern zusätzlich die Ionenstärke der Reaktionslösung für das Ausmass der gefundenen Racemisierung verantwortlich. Ausserdem weisen sie eine starke Abhängigkeit von der Art der zugesetzten Base und vom verwendeten Lösungsmittel nach, wobei die Racemisierungstendenz in der Reihenfolge $\text{NO}_2\text{CH}_3 > \text{CH}_3\text{CN} > \text{CHCl}_3 > \text{DMF} > \text{Dioxan}$ abnimmt.

Die Oxazolonbildung stellt einen zweiten wichtigen Racemisierungsmechanismus dar. Schon früh wurde festgestellt (62), dass N-acylierte Aminosäuren, deren Carboxylgruppen aktiviert sind, nicht nur direkt, sondern auch via ein Oxazolonzwischenprodukt mit der Aminokomponente zum entsprechenden Peptid reagieren können. Diese Oxazolone haben die unerwünschte Eigenschaft, dass sie ein resonanzstabilisiertes Carbanion durch Ionisierung an C-4 bilden können.



Dies ist natürlich mit dem Verlust der sterischen Einheitlichkeit verbunden, da das Carbanion (I) eine planare Konfiguration besitzt und das Proton von beiden Seiten wieder anlagern kann. Stark elektronegative Substituenten X (63) sowie im Reaktionsgemisch vorhandene Basen fördern die Oxazolombildung und damit die Racemisierung der Carboxylkomponente. Ausserdem ist hier wie bei der oben beschriebenen direkten Carbanionbildung eine auffällige Abhängigkeit von der Art der verwendeten Lösungsmittel und der Konzentration der Chloridionen zu beobachten (61).

4. 4. 2 Methoden zur quantitativen Erfassung des Racemisierungsgrades

Die meisten der in neuerer Zeit beschriebenen Methoden verwenden ein Modellpeptid, dessen Komponenten relativ leicht zugänglich sind und ohne Schwierigkeiten auf ihre optische Reinheit geprüft werden können. Der Acylrest an der α -Aminogruppe der Carboxylkomponente dieses Modellpeptids muss so beschaffen sein, dass er mit der aktivierten Carboxylgruppe zu einem Oxazolon reagieren und somit racemisieren kann.

1. Der Anderson-Test

G.W. Anderson et al. (64,65) kuppeln Z-Gly-L-PheOH mit GlyOEt und arbeiten auf Neutralkörper auf. Von demselben wird eine 2%-ige Lösung in heissem abs. EtOH hergestellt, aus der beim Abkühlen das racemische Z-Gly-D,L-Phe-GlyOEt quantitativ auskristallisiert und bestimmt werden kann, während die reine L-Form in Lösung bleibt. Es kann noch ein Racemisierungsgrad von unter 1% bestimmt werden.

2. Der Weygand-Test

Die Epimeren des bei der Kupplung von N-TFA-L-Pro-L-ValOH mit L-ProOMe gebildeten, N-geschützten Tripeptidesters lassen sich nach Weygand et al.(66) nach normalem Aufarbeitungsprozedere auf gaschromatographischem Weg mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5\%$ bestimmen, wobei Lösungsmittel, Nebenprodukte und Ausgangssubstanzen nicht stören.

3. Der Young-Test

Drei Kriterien bestimmen den optischen Reinheitsgrad des von Young et al.(67,68) bei der Kupplung von Bzo-L-LeuOH mit GlyOEt erhaltenen, meist kristallinen Benzoyldipeptidesters: Schmelzpunkt, IR-Spektrum und optische Drehung. Aus der Abweichung des $[\alpha]_D$ vom Sollwert $-34,0^\circ$ der reinen L-Form kann der Racemisierungsgrad auf 1% genau bestimmt werden.

4. Die NMR-Methode

Der neueste, von Weinstein et al.(69) beschriebene Test benutzt als Modellpeptid Acetyl-L-Phe-L-AlaOMe. Dadurch, dass sich nach der Aufarbeitung keine Ionen mehr in der Messlösung befinden, werden die diamagnetischen Einflüsse des Phenylrings von Phenylalanin auf die α -Methylgruppe des Alanins, die je nach sterischer Anordnung stärker oder schwächer sind, im NMR-Spektrum sichtbar. Die Shift-Differenz zwischen L,L-Form und D,L-Form beträgt 6 Hz in $CDCl_3$. Die Messungen sind auf $\pm 3\%$ genau.

5. Der Izumiya-Test

Izumiya et al. (8,9) kuppeln Z-Gly-L-AlaOH mit L-LeuOBz zum N-geschützten Tripeptidester und spalten nach dem Ausschüt-

teln die beiden Schutzgruppen durch katalytische Hydrogenolyse ab. Ein genau definiertes Quantum des freien Tripeptids wird auf einem Aminosäureanalysator nach Stein-Moore chromatographiert, wobei das Gly-L-Ala-L-LeuOH und die entsprechende D-Ala-Verbindung zwei in der Retention stark verschiedene Peaks ergeben. Es können noch Anteile an D-Form von unter 1% quantitativ erfasst werden.

Die Methode hat neben ihrer Präzision und der einfachen Handhabung zusätzlich noch den Vorteil, dass gleichzeitig mit dem Racemisierungstest auch eine sehr genaue Ausbeutebestimmung möglich ist.

4. 4. 3 Racemisierung bei der Phosphor-Imidazol-Kupplung durch Carboxylaktivierung

Wie in früheren Arbeiten bewiesen wurde (14,60), ist die Racemisierungstendenz bei Peptidsynthesen mit Aminoaktivierung durch P^{III} -Verbindungen (Phosphorazomethode) sehr ausgeprägt. Nur gerade bei der Verwendung von N-Carbobenzyloxy-geschützten Aminosäuren als Säurekomponenten kann keine Racemisierung festgestellt werden (28), da Z- und Boc-Aminosäuren nicht zu Oxazolombildung neigen (63). Unsere Racemisierungsuntersuchungen lassen deshalb die Versuche mit P^{III} -Aminoaktivierung weg und beschränken sich auf Kupplungen mit P^{III} -Imidazoliden durch Carboxylaktivierung, bei denen wegen des postulierten Reaktionsverlaufs über ein Säure-Imidazolid (Kap. 4.3), einem nicht racemisierungsanfälligen Partikel (85), die Möglichkeit von Racemisierungsfreiheit besteht.

Als Grundlage für die Untersuchungen dient die von Izumiya et al. (8,9) beschriebene Methode mit einer kleinen Modifikation: da die Darstellung von optisch reinem L-Leu-Benzyl-

ester in unserem Labor aus ungeklärten Gründen nicht gelang, wird L-Leu-t-Butylester als Aminokomponente eingesetzt: Das N-geschützte Dipeptid Z-Gly-L-AlaOH wird mit L-LeuOBu^t in CH₃CN mit dem Phosphor-Imidazol-Reagens zum N-geschützten Tripeptidester umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wird eingengt, in EE-Lösung ausgeschüttelt und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand in 80%-iger Essigsäure gelöst, mit 10%-iger Pd-Kohle versetzt und die Z-Schutzgruppe abhydriert. Die t-Butylestergruppe wird anschliessend durch Hydrolyse mit 10n HCl bei ZT abgespalten. Nach dem Trocknen am HV wird das freie Tripeptid in Auftragspuffer gelöst und eine genau definierte Menge zusammen mit zugesetztem Valin-Standard auf einem Aminosäureanalyator chromatographiert. Die Flächen der beiden Peaks der Epimeren Gly-L-Ala-L-LeuOH und Gly-D-Ala-L-LeuOH entsprechen den aufgetragenen Mengen der beiden Verbindungen.

Die Ausbeuten nach Izumiya-Test sind etwas schlechter als die gewogenen Rohausbeuten bei entsprechenden Synthesen von Z-L-Val-L-ValOMe (s. Kap. 4.2.2). Möglicherweise liegt das an den zusätzlichen Aufarbeitungsschritten (Hydrierung, Esterhydrolyse), die zu höheren Verlusten führen können.

Racemisierung bei der Kupplung von 1 Mol Z-Gly-L-AlaOH mit L-LeuOBu^t nach der Phosphor-Imidazol-Methode mit Carboxyl-aktivierung in CH₃CN bei ZT (Einzelversuche)

Chlor-phosphin	Phosphin Mol	Ausbeute Analyse	Retention L-L	Racemisierung D-L
PCl ₃	0,67	77% a)	95,2%	4,8%
Et ₂ PCl	2	86% b)	94,3%	5,7%

a) Mit 1 Mol L-LeuOBu^t

b) Mit 1,5 Mol L-LeuOBu^t

Zusammenfassung

Die Phosphor-Imidazol-Kupplung ist eine sehr einfache und effektive Methode zur peptidartigen Verknüpfung von Aminosäuren und Peptiden. Die Kupplungsreagentien, speziell PCl₃, sind billig und leicht zu beschaffen. Gegenüber den ähnlichen Verfahren von Anderson (74) und Mitin (15) sind die kurzen Reaktionszeiten und die bemerkenswert hohen Ausbeuten unter sehr milden Bedingungen hervorzuheben. Die Racemisierungstendenz ist viel geringer als bei Phosphorazokupplungen nach Giger (14), aber etwas höher als bei der Methode Mitin (15).

Durch ihre Einfachheit und aufgrund der guten Resultate kann die Methode sehr wohl mit etablierten Kupplungsmethoden konkurrieren.

5. Anwendung der Phosphor-Imidazol-Kupplung bei der Solid-phase-Synthese von Peptiden

Die nachstehenden Arbeiten wurden im Labor von Prof. Dr. M. Brenner von Dr. P. Fankhauser auf einer von ihm entwickelten, automatisierten Solid-phase-Syntheseapparatur durchgeführt. Dr. P. Fankhauser möchte ich an dieser Stelle für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Resultate herzlich danken.

Die Solid-phase-Methode nach Merrifield (11) ist eine neuere Art der Peptidsynthese, bei der eine definierte Zahl reaktiver Gruppen auf einer festen Harzphase mit Kupplungsreagentien in einer flüssigen Lösungsmittelphase umgesetzt werden. Durch die Quellung des Harzes im umgebenden Lösungsmittel wird aber in der Gegend der reaktiven Zentren ein ähnlich homogener Zustand wie in einer Lösung geschaffen. An diese Zentren wird nun eine N-geschützte Aminosäure fixiert, die nach dem Abspalten der Schutzgruppe ihrerseits wieder mit einer N-geschützten Aminosäure gekuppelt werden kann. Durch schrittweises Anknüpfen weiterer Aminosäuren können so theoretisch Peptidketten beliebiger Länge und Zusammensetzung aufgebaut werden.

Die Methode hat gegenüber der klassischen Peptidsynthese bedeutende prinzipielle Vorteile:

1. Es kann mit beliebigen Ueberschüssen an Kupplungsreagens und Abspaltungsreagens gearbeitet werden.
2. Die Reinigung der Zwischenprodukte erfolgt durch einfaches Auswaschen des Harzes mit Lösungsmittel.

3. Die Synthese kann vollautomatisiert durchgeführt werden.

Daneben dürfen aber auch die Nachteile dieser Methode nicht übersehen werden:

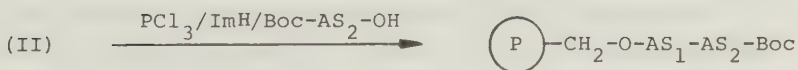
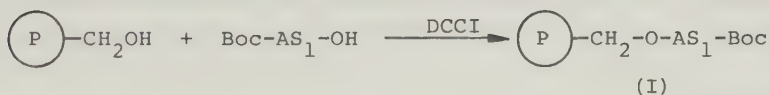
1. Durch Entquellungsvorgänge im Harz können einzelne reaktive Gruppen der Umsetzung mit den zugefügten Reagentien entzogen werden und erst in einer folgenden Stufe wieder reagieren, was naturgemäss zu Fehlsequenzen führt.
2. Bei Ueberschuss an Kupplungsreagens besteht die Gefahr von Backbone-Acylierung, was via Aminoacyleinlagerung, dem basenkatalysierten Einbau einer Aminosäure in eine Amidgruppierung einer Peptidkette (53), wieder zu Fehlsequenzen Anlass geben kann.
3. Bei der Synthese längerkettiger Peptide verändern sich die mechanischen und Quell-Eigenschaften des Harzes in ungünstiger Weise (vergleichbar den Löslichkeitsproblemen bei klassischen Synthesen).

5. 1 Kupplungen mit P^{III} -Imidazoliden auf dem Harz

Nachdem die Phosphor-Imidazol-Methode mit Carboxylaktivierung in Lösung bei klassischen Peptidsynthesen zum Teil sehr befriedigende Ergebnisse geliefert hatte (s. Kap. 4.2), lag es nahe, sie auch auf dem Gebiet der Solid-phase-Synthese zu testen. Bei dieser Form der Peptidsynthese ist ein Kupplungsreagens, das möglichst 100% Ausbeute in kurzer Zeit liefert, erste Voraussetzung für ein einigermaßen einheitliches Produkt.

Für die Versuche wurden Boc-Aminosäuren auf ein hydroximethyliertes, mit 2% Divinylbenzol quervernetztes Polystyrolharz gekuppelt. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 4 n HCl/Dioxan wurde die Beladung des Harzes durch Wegwaschen der an die freien Aminogruppen gebundenen HCl mit Hilfe von Triäthylamin (TEA) und Titration dieser HCl bestimmt.

Pro Versuch wurden 50 mg Harz mit einer Beladung von 0.8 m Mol Aminosäure pro g Harz für die Reaktion mit Phosphor-Imidazol-Reagens und aufzukuppelnder Boc-Aminosäure - in je 150%igem Ueberschuss - eingesetzt. Die Kupplungsausbeuten wurden vor dem Abspalten der Schutzgruppe mit Hilfe der Esko-Methode (12) bestimmt. Folgendes Schema soll die Operation verdeutlichen:



Es wurden Synthesen mit PCl_3 , EtPCl_2 und Et_2PCl durchgeführt, wobei als Lösungsmittel CH_2Cl_2 , Dioxan und CH_3CN dienen. Als aufzukuppelnde Boc-Aminosäure wurde ausschliesslich Boc-Glycin, als Aminokomponente auf dem Harz (Harztypen) neben Glycin auch Phenylalanin und Valin verwendet.

Auf ein Mol Boc-Aminosäure wurden immer 6 Mol Imidazol zugegeben.

Es wurden vier verschiedene Varianten der Reagentienzugabe zum Harz getestet.

Variante A:

Imidazol in LM vorlegen, P^{III} -Verbindung in LM gelöst unter Rühren zugeben und bei ZT reagieren lassen. Nach 5 Min. das Boc-Glycin in LM zugeben, 5 Min. rühren und das Reaktionsgemisch zum Aminoacylharz giessen.

Variante B:

Imidazol gemeinsam mit Boc-Glycin in LM vorlegen, P^{III} -Verbindung in LM unter Rühren zugeben, bei ZT während 5 Min. reagieren lassen und das Reaktionsgemisch zum Harz zugeben.

Variante C:

Imidazol und Boc-Glycin in LM zum Aminoacylharz giessen und 5 Min. warten. Danach die P^{III} -Verbindung in LM zugeben und schütteln.

Variante D:

P^{III} -Verbindung in LM gelöst zum Aminoacylharz geben und bei ZT reagieren lassen. Nach 5 Min. das Boc-Glycin in LM zugiessen, 5 Min. warten und dann das Imidazol in LM zugeben.

Die Kupplungsbedingungen waren einheitlich 1 Std. Reaktionszeit bei ZT.

Kupplungen von 1 Mol Boc-Glycin mit 0,4 Mol einer Aminokomponente auf Polystyrol-DVB-Harz nach der Phosphor-Imidazol-Methode bei ZT während 1 Std. (Einzelversuche)

Harztyp	P ^{III} - Verbdg.	Mol P ^{III}	Zugabe- variante	LM	Ausbeute Esko (12)
Boc-Gly	PCl ₃	0,67	B	CH ₂ Cl ₂	97,6 %
"	EtPCl ₂	1	B	"	93,0 %
"	Et ₂ PCl	2	B	"	97,7 %
"	"	2	A	"	86,2 %
"	"	2	C	"	91,6 %
"	"	2	D	"	70,2 %
"	"	2	B	Dioxan	80,7 %
"	"	2	B	CH ₃ CN	81,0 %
Boc-Phe	PCl ₃	0,67	B	CH ₂ Cl ₂	86,7 %
"	Et ₂ PCl	2	B	"	78,9 %
Boc-Val	PCl ₃	0,67	B	"	94,9 %
"	Et ₂ PCl	2	B	"	86,3 %

5. 2 Racemisierung bei der Solid-phase-Synthese mit der Phosphor-Imidazol-Methode

Da Peptidsynthesen in der Festphase mit den aus der klassischen Peptidchemie bekannten Kupplungsreagentien oft nicht gleich ablaufen wie in homogener Lösung, scheint eine Untersuchung der Racemisierungstendenz der Phosphor-Imidazol-Methode bei der Solid-phase-Synthese angezeigt.

Schnittbilder von Polystyrol-Divinylbenzol-Harzkügelchen mit aufgekuppelten, radioaktiv markierten Aminosäuren zeigen, dass dieselben gleichmässig auf das ganze Volumen der Kügelchen verteilt und nicht nur auf der Oberfläche fixiert sind (92). Bei der Porengrösse des vernetzten Harzes im gequollenen Zustand und der deshalb fehlenden Lösungsmitteldurchmischung im Innern bedeutet dies, dass Reaktionen der ans Harz gebundenen Aminosäuren mit im Lösungsmittel zugegebenen Reagentien diffusionskontrolliert sein können. Diese Tatsache könnte unter Umständen zu einem ganz andern Reaktionsverlauf als in homogenen Lösungen führen. Möglicherweise ist dieser Fall bei den Phosphor-Imidazol-Kupplungen auf dem Harz eingetreten. Anlass zu dieser Vermutung geben die Racemisierungsuntersuchungen bei der Synthese optisch aktiver Peptide nach dieser Methode.

Die Grundlage für diese Untersuchungen bildet der Racemisierungstest nach Izumiya et al. (8,9) (s. Kap. 4.3.2). Im Gegensatz zur in der Literatur beschriebenen Methode wird das Tripeptid Gly-Ala-LeuOH nicht durch die eine Kupplung zwischen Z-Gly-L-AlaOH und L-LeuOBz dargestellt, sondern durch schrittweise Verknüpfung der einzelnen Komponenten. Dabei wird von dem auf dem Harz fixierten Boc-L-Leu die Schutzgruppe abgespalten, Boc-L-AlaOH mit der Phosphor-Imidazol-

Methode angekuppelt, die Boc-Gruppe wieder abgespalten und zum Schluss Boc-GlyOH nach der gleichen Methode angehängt. Nach Entfernen der Schutzgruppe und der Abspaltung vom Harz kann das freie Tripeptid auf einem Aminosäureanalysator auf Racemisierung untersucht werden.

Hatten die klassischen Kupplungen mit Phosphor-Imidazol-Reagens in Acetonitrillösung einen Racemisierungsgrad von ca. 5% ergeben, so findet man nun bei den Solid-phase-Synthesen ziemlich genau 50% der D-Ala-Form. Auch wenn man entgegen den bisherigen Erkenntnissen (63) annimmt, dass nicht nur die Säurekomponente, sondern auch die Aminokomponente bei der Kupplung racemisiert und somit das L-Alanin zweimal, das L-Leucin einmal (die D-Leu-Form des Tripeptids hat auf der Stein-Moore-Säule die gleiche Retention wie die D-Ala-Form und vergrößert deshalb den gleichen Peak) Gelegenheit hätten, ihre sterische Einheitlichkeit zu verlieren, so kann das den gefundenen Racemisierungsgrad noch nicht befriedigend erklären. Zieht man noch in Betracht, dass Aminosäuren mit Alkyloxycarbonyl-Schutzgruppen (Z-,Boc-) auffallend geringe Racemisierungstendenz zeigen (63) und ein unter gleichen Bedingungen durchgeführter Parallelversuch mit DCCI als Kupplungsreagens nur 4,5% epimeres Produkt liefert, so muss tatsächlich mit einem andern Reaktionsverlauf als in Lösung gerechnet werden. Als Racemisierungsmechanismus wäre die direkte Ionisierung am C α des Alanins durch die in aprotischen Lösungsmitteln stark basischen Chloridionen (61) bei einer diffusionskontrollierten Reaktion denkbar. Ob auch ein anderer Kupplungsmechanismus als in Lösung wirksam ist, müsste in weiteren Versuchen genauer abgeklärt werden.

Als Aktivierungsmittel bei diesen Kupplungen wurden immer 0,67 Mol PCl_3 und 6 Mol Imidazol pro Mol Boc-Aminosäure, die in

einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ Mol pro 10 ml CH_2Cl_2 vorlag, eingesetzt. Die Kupplungsdauer betrug für jede Stufe 3 Std. bei ZT. Die Darstellung des Kupplungsreagens wurde in einem Gefäß ausserhalb des Reaktors auf zwei verschiedene Arten durchgeführt.

Variante A:

Boc-Aminosäure und Imidazol in CH_2Cl_2 vorlegen, PCl_3 innert 5 Min. zugeben und nach 5 Min. Reaktionszeit zum Aminoacylharz giessen.

Variante B:

PCl_3 in CH_2Cl_2 vorlegen, Boc-Aminosäure und Imidazol in CH_2Cl_2 zugeben, 5 Min. reagieren lassen und dann zum Aminoacylharz giessen.

Racemisierung bei der schrittweisen Synthese von Gly-?-Ala-L-LeuOH mit PCl_3 -Imidazol-Reagens in CH_2Cl_2 bei ZT auf Polystyrol-DVB-Harz (Einzelversuche)

Harztyp	Zugabe- variante	Retention L-L	Racemisierung D-L
Boc-Leu	A	55,0%	45,0%
Boc-Leu	B	48,7%	51,3%

Schlussfolgerungen

Einige orientierende Einzelversuche zur Kupplung einer Boc-Aminosäure an eine auf einem Harz fixierte Aminokomponente mit der Phosphor-Imidazol-Methode verlaufen bei ZT rasch und mit guter Ausbeute. Dabei spielen vermutlich die Art des Lösungsmittels und die Technik der Reagentienzugabe eine Rolle, wobei die Lösungsmittelabhängigkeit wahrscheinlich zum Teil vom unterschiedlichen Quellverhalten des Harzes bestimmt wird. Zwei Racemisierungsprüfungen bei Boc-Aminosäure-Kupplungen ergeben erstaunlicherweise 50% Racemisierung der optisch aktiven Komponenten, was im Falle einer Verifizierung dieser Resultate die Anwendungsmöglichkeiten dieser Kupplungsmethode bei Solid-phase-Synthesen stark einschränkt.

Experimenteller Teil

Verzeichnis der Abkürzungen

Ae	Aether	ø-	Phenyl
AcOH	Eisessig	Z-	Carbobenzoxy
Be	Benzol	ZT	Zimmertemperatur
BuOH	n-Butanol	DC	Dünnschichtchro-
EE	Essigester		matogramm
EtOH	Aethanol	HV	Hochvakuum
MeOH	Methanol	IR	Infrarot
Pe	Petroläther	LM	Lösungsmittel
Py	Pyridin	NMR	Kernresonanz
TEA	Triäthylamin	UV	Ultraviolett
TFA	Trifluoressigsäure		
		S	Singlett
Boc-	Butyloxycarbonyl	D	Duplett
Bz-	Benzyl	T	Triplett
Bzo-	Benzoyl	Q	Quadruplett
CBI	Carbonylbisimidazol	ko	komplex
DCCI	Dicyclohexyl-carbodiimid		
ImH	Imidazol		

Die Abkürzungen für Aminosäuren (AS) und Peptide entsprechen den Richtlinien der "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature" (70).

6. Allgemeines

Die angegebenen Ausbeuten bei Peptidkupplungen beziehen sich auf Rohsubstanzen (chromatographisch rein).

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Block bestimmt und sind unkorrigiert.

Die Elementaranalysen wurden nach der üblichen Trocknung der Substanzen bei erhöhter Temperatur am Hochvakuum von Herrn E. Thommen im Mikrolabor des Instituts für Organische Chemie durchgeführt.

Die IR-Spektren wurden auf einem Spektrographen vom Typ Beckmann IR-8 aufgenommen. Für die Chlorphosphin-spektren stand eine in Zusammenarbeit mit Herrn K. Aegerter entwickelte Zelle mit einem 0.05 mm-Teflonspace zur Verfügung, die Aufnahmen in der Filmtechnik erlaubte. Die wichtigsten Banden werden jeweils durch die Angabe ihrer Wellenzahl charakterisiert.

Die 60 MHz-NMR-Spektren wurden von Herrn K. Aegerter auf einem VARIAN A-60-Gerät im Spektrallabor des Instituts für Organische Chemie aufgenommen. Die beobachteten Verschiebungen werden in δ -Werten, die Kopplungskonstanten in Hz in eckigen Klammern und die Zuordnung in runden Klammern angegeben. Komplexe Signale sind durch ihre ungefähre Verschiebung und die Abkürzung ko für komplex charakterisiert.

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden zum Teil auf Kieselgel-G-Schichten MERCK mit Zinksilikat als UV-Indikator durchgeführt, zum Teil standen kieselgelbeschichtete Fertigplatten als Geschenk der Firma CIBA-GEIGY AG zur

Verfügung. Als Fließmittel wurden verwendet:

- a) CHCl_3 : MeOH 2 : 1
- b) CHCl_3 : MeOH 9 : 1
- c) CHCl_3 : Aceton 8 : 2
- d) n-BuOH : Py : AcOH : H_2O 30 : 20 : 6 : 24

Die Substanzflecken wurden mit Ninhydrin (1), Cl_2 /Tolidin (2) und unter UV-Licht 254 nm nachgewiesen. Die R_f -Werte sind Richtwerte, da sie nur unter streng standardisierten Bedingungen reproduzierbar sind.

Die verwendeten Lösungsmittel waren von der Qualität 'purum' und 'puriss' der FLUKA AG, Buchs, oder sie wurden nach gängigen Methoden (91) absolutiert.

Die optischen Drehungen wurden auf einem Polarimeter vom Typ PERKIN-ELMER 141 gemessen.

Für die p^{III}-Gehaltsbestimmungen stand eine thermostatisierte Kleinhydrierapparatur nach Clauson-Kaas (84) (Zeichnung S. 26) im Mikrolabor von Herrn E. Thommen zur Verfügung.

Die Epimerisierungsuntersuchungen des von uns dargestellten Tripeptids Gly-L-Ala-L-LeuOH wurden im Chromatographielabor der Pharma-Wiss. Abteilung der CIBA-GEIGY AG von den Herren von Arx und Linder auf einem automatischen Aminosäureanaly-sator der Firma Technicon durchgeführt.

Die IR- und NMR-Spektren der Chlorphosphine wurden von Herrn Prof. Dr. L. Jenny am Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Basel photographiert.

Allen genannten Herren möchte ich für ihre Arbeit, die, bedingt durch die Natur der Chlorphosphine, oft recht unangenehm war, und für ihr freundliches Entgegenkommen an dieser Stelle bestens danken.

7. Peptidsynthesen mit Alkylchlorphosphinen als Kupplungsreagentien

7. 1 Herstellung der Ausgangssubstanzen

Umgang mit Alkylchlorphosphinen

Arbeiten mit Alkyl- und Arylchlorphosphinen erfordern aufgrund der ausgeprägten Reaktivität dieser Substanzklasse besondere Vorsichtsmassnahmen. Da sie sehr leicht durch feuchte Luft zu Salzsäure und den entsprechenden Phosphor-III- säuren hydrolysiert werden, sollten alle Manipulationen im Abzug und unter trockener Stickstoffatmosphäre ausgeführt werden.

Dies ist auch notwendig im Hinblick auf die Auswirkungen auf den menschlichen Organismus. Die Substanzen erzeugen beim Einatmen durch die freigesetzte Salzsäure Hustenreiz, und ihr penetranter Geruch verursacht Uebelkeit und Brechreiz. Ihre Toxizität ist nicht erwiesen, muss aber in Betracht gezogen werden.

Aethyldichlorphosphin

Modifizierte Darstellung nach Schliebs und Kaiser (3)

In einem trockenen Sulfierkolben mit Gaseinleitungsvorrichtung werden 152 g (1.14 Mol) Aluminiumtrichlorid mit 78.5 g (0.57 Mol) Phosphortrichlorid versetzt und dann langsam über P_2O_5 getrocknetes Aethylchlorid durchgeleitet. Nach einiger Zeit setzt eine exotherme Reaktion ein, und das Aluminiumchlorid geht langsam in Lösung. Unter Rühren und gelegentlichem Kühlen bei 60°C mit Hilfe von Eiswasser

wird weiter Aethylchlorid durchgeleitet bis alles AlCl_3 gelöst ist, worauf die Reaktion während 2 Std. bei 80°C vervollständigt wird. Das überschüssige EtCl wird am Wasserstrahlvakuum bei 15 Torr und 80°C entfernt, worauf zur farblosen Lösung ca. 20 Prozent eines Gemisches von 10.3 g (0.38 Mol) Aluminiumpulver und 177 g (3.02 Mol) Natriumchlorid zugegeben werden. Beim Aufheizen auf 100°C setzt eine exotherme Reaktion ein, die durch Kühlen bei 120°C kontrolliert wird. Der Rest des Reduktionsgemisches wird portionenweise zugegeben bis die Reaktion beendet ist. An den Sulfierkolben wird nun eine in Methanol-Trockeneis gekühlte Vorlage gehängt und das Aethyldichlorphosphin bei 120°C und 15 Torr vorsichtig abdestilliert. Das Rohprodukt wird bei Normaldruck nochmals fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 61.9 g (82%)

Sdp.: $110 - 112^\circ\text{C}$

Dichte: 1.26 g/ml

IR- und NMR-Spektren: Seite 78

Diaethylchlorphosphin

Modifizierte Methode nach I.P. Komkov et al. (5)

Durch eine Suspension von 26.4 g (0.2 Mol) Aluminiumtrichlorid in 25.9 g (0.2 Mol) Aethyldichlorphosphin in einem N_2 -gespülten Sulfierkolben mit Gaseinleitungsrohr wird über P_2O_5 getrocknetes Aethylchlorid geleitet. Unter Wärmeentwicklung geht das AlCl_3 langsam in Lösung, wobei jeweils bei 80°C mit Eiswasser gekühlt wird. Unter Rühren wird weiter EtCl durchgeleitet bis eine homogene Lösung entstanden ist.

Nach einiger Zeit beginnt das Reaktionsgemisch zu kristallisieren, worauf das Gefäß auf -15°C abgekühlt wird. Das weiterhin eingeleitete Aethylchlorid kondensiert nun und löst die Kristalle wieder auf. Die klare, farblose Lösung kann danach über Nacht fertig reagieren. Der EtCl - Ueberschuss wird am nächsten Tag am Vakuum bei 80°C vollständig entfernt und der verbleibende, farblose Kristallkuchen mit 20 Prozent einer Mischung von 3.36 g (0.133 Mol) Aluminium und 24 g (0.33 Mol) Kaliumchlorid vermengt. Beim Aufheizen schmilzt das Gemisch bei $130 - 140^{\circ}\text{C}$ und reagiert exotherm. Der Rest des Reaktionsgemisches wird portionenweise zugegeben, bis die Reaktion abklingt. Bei $140 - 180^{\circ}\text{C}$ Badtemperatur wird das Produkt unter Vakuum vorsichtig in eine in Methanol- Trockeneis gekühlte Vorlage destilliert. Das rohe Et_2PCl wird durch Destillation bei $69 - 71^{\circ}\text{C}/100$ Torr nochmals gereinigt.

Vorsicht: Diäthylchlorphosphin kann sich mit Luftsauerstoff entzünden! Alle Operationen sind deshalb unter Stickstoffatmosphäre durchzuführen.

Ausbeute: 19.8 g (80%)

Sdp.: $131 - 133^{\circ}\text{C}$

Dichte: 1.02 g/ml

IR- und NMR-Spektren: Seite 79

Methyldichlorphosphin

Nach Perry et al. (4)

In einer Druckflasche werden 50.5 g (1 Mol) Methylchlorid kondensiert (bei -75°C), 200 g (1.5 Mol) Aluminiumtrichlorid und 137.5 g (1 Mol) Phosphortrichlorid vorgekühlt zugegeben und über Nacht geschüttelt. Das farblose, kristalline

Produkt wird unter Kühlen in Diäthylphthalat gelöst, die Lösung auf 75°C geheizt und bei 15 Torr entgast. Nach raschem Kühlen auf 30°C werden unter heftigem Rühren 81 g (0.66 Mol) frisch gemahlenes Antimon zugegeben. Das Gemisch erwärmt sich auf 65°C, wobei sich ein weisser Niederschlag von Antimontrichlorid bildet. Nachdem der grösste Teil Antimon verbraucht ist, wird das Methyldichlorphosphin bei 75°C und 15 Torr in eine in Methanol-Trockeneis gekühlte Vorlage destilliert. Die farblose Flüssigkeit wird durch Destillation bei Normaldruck nochmals gereinigt.

Ausbeute: 104.7 g (90%)

Sdp.: 78 - 80°C

Dichte: 1.28 g/ml

IR- und NMR-Spektren: Seite 80

Aethylphosphonsäuredichlorid

In einem stickstoffgespülten Kolben mit Rückflusskühler und Gaseinleitungsrohr werden 14.7 g (0.112 Mol) frisch destilliertes Aethyldichlorphosphin vorgelegt und in H₂SO₄ getrockneter Sauerstoff durchgeleitet. Nach einiger Zeit setzt eine exotherme Reaktion ein, nach deren Abklingen der Gefässinhalt auf 50°C erwärmt und weiter O₂ durchgeleitet wird. Die Zunahme des P=O - Peaks bei 1280 cm⁻¹ wird IR-spektroskopisch verfolgt und damit das Ende der Reaktion bestimmt. Die Gewichtszunahme beträgt 1.5 g (83% der Theorie).

Ausbeute: 16.2 g (98%)

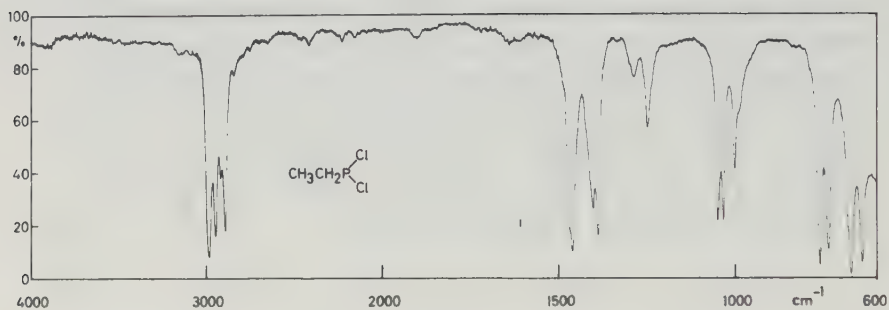
IR- und NMR-Spektren: Seite 81

Dichte: 1.37 g/ml

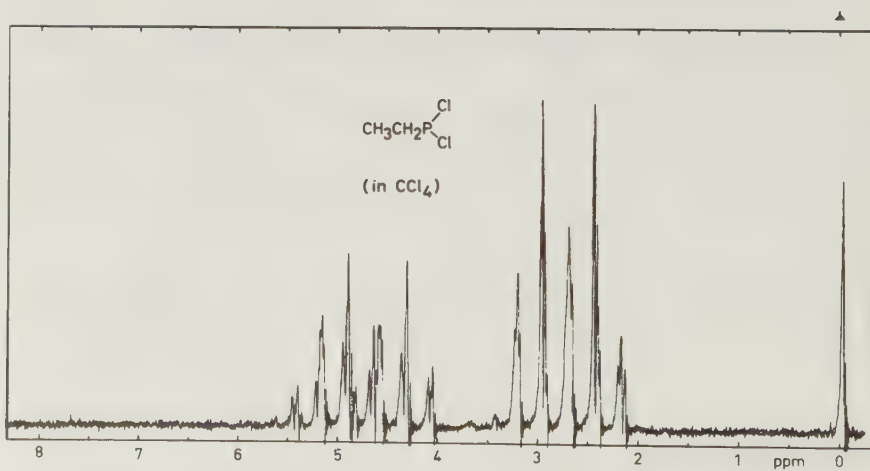
C₂H₅POCl₂
(146.95)

	C	H
ber.	16.35%	3.42%
gef.	16.33%	3.62%

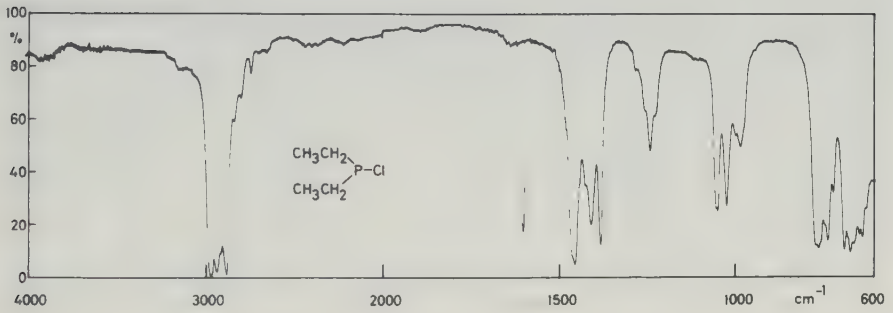
IR-Spektrum (Film 0,05 mm)



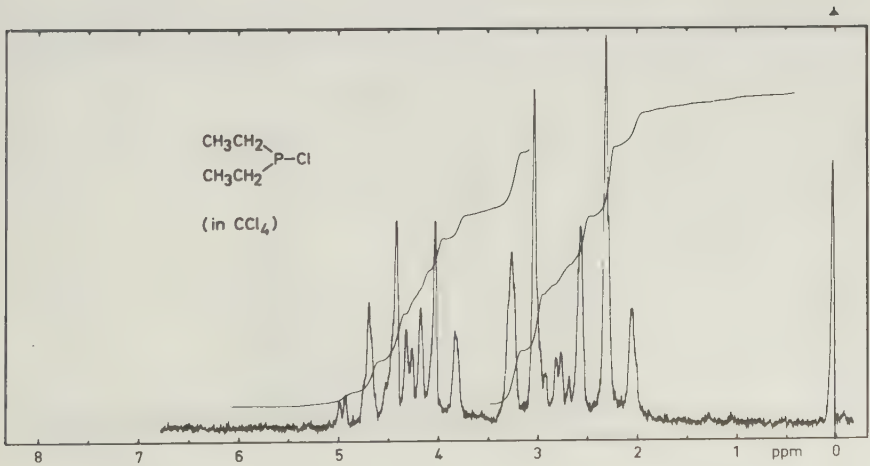
NMR-Spektrum 60 MHz



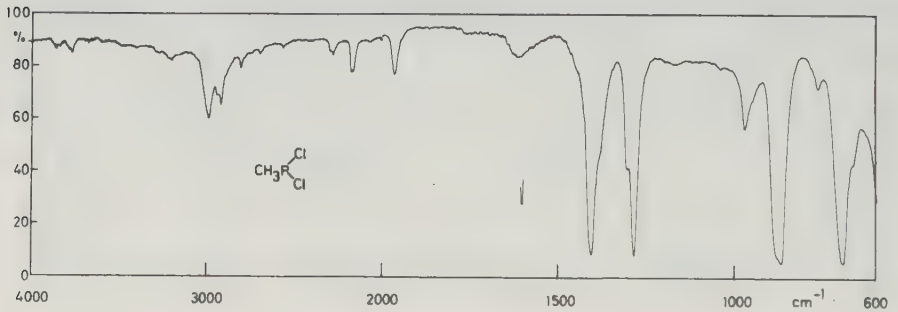
IR-Spektrum (Film 0,05 mm)



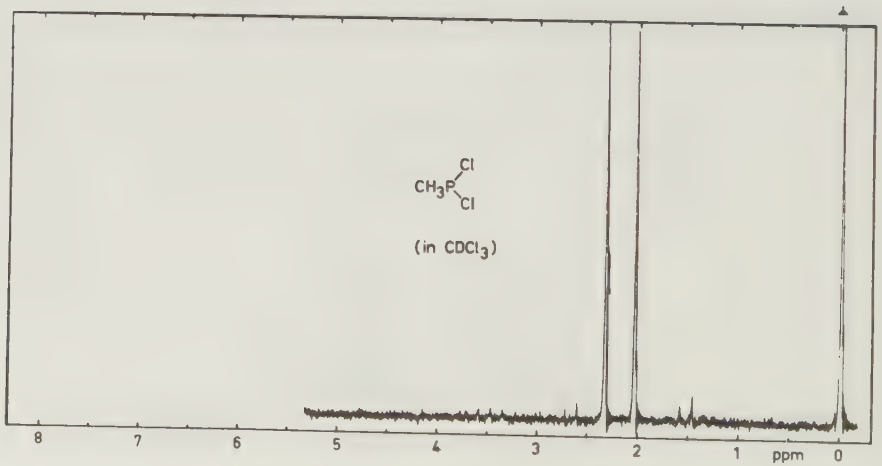
NMR-Spektrum 60 MHz



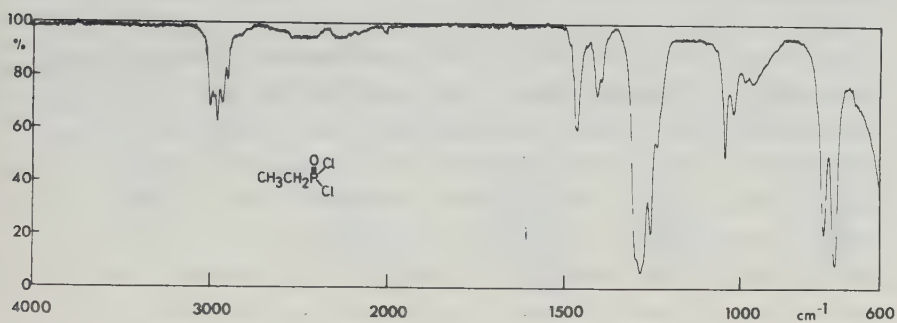
IR-Spektrum (Film 0,05 mm)



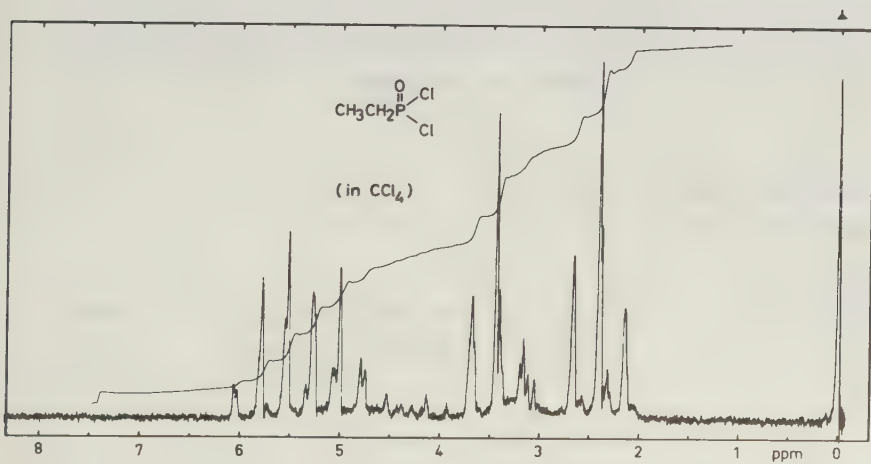
NMR-Spektrum 60 MHz



IR-Spektrum (Film 0,05 mm)



NMR-Spektrum 60 MHz



7. 2 Peptidsynthesen mit Methylchlorphosphin

Z-glycyl-glycin-äthylester 5*

In einem mit trockenem Stickstoff gespülten Reaktionsgefäß werden 0,380 g ($2,74 \cdot 10^{-3}$ Mol) Glycinäthylester-Hydrochlorid in 10 ml abs. Py aufgeschlämmt und auf 0°C abgekühlt. Unter Rühren werden 0,25 ml ($2,74 \cdot 10^{-3}$ Mol) Methylchlorphosphin mit einer Spritze zugegeben. Nach 15 Min. Reaktionszeit werden 0,573 g ($2,74 \cdot 10^{-3}$ Mol) Z-Glycin zugefügt, das Eisbad entfernt und bei ZT weiterreagieren gelassen. Der Verlauf der Reaktion wird auf DC verfolgt. Nach 4 Std. ist praktisch kein Glycinäthylester mehr im Reaktionsgemisch vorhanden, worauf das Lösungsmittel am Vakuum entfernt wird. Der leicht gelbe Rückstand wird mit EE und wenig H_2O in einen Scheidetrichter überführt und mit 2n HCl, gesättigter Na-bicarbonatlösung und H_2O ausgeschüttelt. Die EE-Lösung wird über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft und der Z-glycyl-glycin-äthylester-Rückstand am HV und im Exsikkator über P_2O_5 vollständig getrocknet. Beim Umkristallisieren aus EE/Pe erhält man farblose Plättchen.

Ausbeute: 0,663 g (83%)

Smp.: $76 - 78^{\circ}\text{C}$

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$

(294,19)

ber.

gef.

C

57,13%

56,97%

H

6,17%

6,13%

N

9,52%

9,59%

Z-L-valyl-glycin-äthylester 6*

Darstellung analog 5*

Reaktionsdauer: 5 Std./ZT

Ausbeute: 73%

Umkristallisation aus EE/Pe, farblose Nadeln

Smp.: 160 - 162°C

$C_{17}H_{24}N_2O_5$		C	H	N
(336,4)	ber.	60,70%	7,19%	8,33%
	gef.	60,81%	7,29%	8,31%

Z-L-valyl-L-valin-methylester 7*

Darstellung analog 5*, aber mit einem Ueberschuss

(1,5 Äquivalente) an Z-L-Valin

Reaktionsdauer: 23 Std./ZT

Ausbeute: 85% (bezogen auf L-Valin-methylester)

Umkristallisation aus EtOH/H₂O, farblose Nadelchen

Smp.: 106 - 108°C

$C_{19}H_{28}N_2O_5$		C	H	N
(364,45)	ber.	62,62%	7,74%	7,69%
	gef.	62,83%	7,90%	7,69%

7. 3 Peptidsynthesen mit Aethyldichlorphosphin

Z-glycyl-glycin-äthylester 5a*

Darstellung analog 5*, aber mit Aethyldichlorphosphin anstelle von Methyldichlorphosphin.

Reaktionsdauer: a) 90 Min./ZT

b) 20 Std./ZT

Ausbeuten: a) 82%

b) 86%

Produktdaten identisch mit 5*

Z-L-valyl-L-valin-methylester 7a*

Darstellung analog 7*

Reaktionsdauer: 20 Std./ZT

Ausbeute: 91%

Produktdaten identisch mit 7*

7. 4 Peptidsynthesen mit Diäthylchlorphosphin

Z-glycyl-glycin-äthylester 5b*

Darstellung analog 5*

Reaktionsdauer: 20 Std./ZT

Ausbeute: 70%

Produktdaten identisch mit 5*

Z-glycyl-glycin-äthylester 5c*

In einem trockenen, mit N₂ gespülten Gefäss werden 0,140 g (10^{-3} Mol) Glycinäthylester-Hydrochlorid in 4 ml abs. Py suspendiert und unter Rühren auf 0°C gekühlt. Zu der Aufschlammung gibt man auf einmal 0,25 ml ($2 \cdot 10^{-3}$ Mol) Diäthylchlorphosphin und lässt 5 Min. reagieren. Dann werden 0,209 g (10^{-3} Mol) Z-Glycin zugegeben, die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch bei ZT weitergerührt. Nach 15 Min. wird die Reaktion durch Zugabe von wenig Wasser unterbrochen und das LM am Vakuum eingedampft. Der leicht gelbe Rückstand wird analog 5* aufgearbeitet.

Ausbeute: 0,257 g (90%)

Produktdaten identisch mit 5*

Z-glycyl-glycin-äthylester 5c*

Darstellung analog 5c*

Reaktionsdauer: 20 Std./ZT

Ausbeute: 91%

Produktdaten identisch mit 5*

8. Peptidsynthesen mit Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen

8. 1 Darstellung von Vergleichssubstanzen zur Abklärung des Kupplungsmechanismus'

Z-Glycin-anhydrid 8*

Nach Schüssler et al. (6)

In einem trockenen Gefäß werden 2,1 g (10^{-2} Mol) Z-Glycin in 40 ml abs. CH_3CN gelöst und unter heftigem Rühren eine Lösung von 1,03 g ($5 \cdot 10^{-3}$ Mol) DCCI in 10 ml CH_3CN dazugegossen. Nach wenigen Sekunden setzt eine exotherme Reaktion ein, wobei gleichzeitig kristalliner Dicyclohexyl-harnstoff ausfällt. Das Reaktionsgemisch wird 22 Std. gerührt, der Harnstoff abfiltriert und die Lösung eingeengt. Die klebrigen, farblosen Kristalle werden in EE aufgenommen und abwechselungsweise mit eiskalter, gesättigter Na-bicarbonatlösung und ebenfalls eiskaltem H_2O ausgeschüttelt. Die EE-Lösung wird über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft, wobei farblose Kristalle ausfallen. Nach Umkristallisationen aus Be und anschliessend aus CHCl_3 erhält man feine, farblose Nadeln.

Ausbeute: 0,224 g (11%)

Smp.: 117 - 121°C

IR in Nujol: 3340, 2930, 1825, 1760, 1690

NMR 60 MHz in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: 7,34 S (Aromat), 5,07 S ($\text{Ø-CH}_2\text{-NH}$)
2,38 D [6 Hz] ($\text{-NH-CH}_2\text{-CO}$)

Z-glycyl-imidazolid 9*

Zu einer Suspension von 0,209 g (10^{-3} Mol) Z-Glycin in 2 ml CHCl_3 wird eine Lösung von 0,270 g (10^{-3} Mol) 60%-igem CBI in CHCl_3 gekippt, worauf praktisch spontan eine klare Lösung entsteht. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht stehen gelassen, dann mit wenig H_2O ausgeschüttelt und sofort anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Von dieser Lösung werden zur Identifizierung des Imidazolids Chromatogramme entwickelt und IR-Spektren aufgenommen.

IR in CHCl_3 : 3450, 3140, 3000, 1760, 1735

DC in a): R_f ca. 0,8; Cl_2 /Tolidin positiv; wenig Z-Glycin und Imidazol noch vorhanden.

8. 2 Peptidsynthesen mit Chlorphosphinen und Imidazol durch Aminoaktivierung

Z-glycyl-glycin-äthylester 5d*

In einem mit trockenem Stickstoff gespülten Kolben werden 0,408 g ($6 \cdot 10^{-3}$ Mol) Imidazol in 1 ml CH_3CN vorgelegt und bei 0°C unter Rühren mit 0,104 ml (10^{-3} Mol) Aethyldichlorphosphin versetzt. Nach 20 Min. Reaktionszeit bei ZT werden 2 ml CH_3CN , nach weiteren 10 Min. 0,140 g (10^{-3} Mol) Glycin-äthylester-Hydrochlorid zugegeben, worauf sich in der farblosen Lösung ein flockiger Niederschlag von Imidazol-Hydrochlorid bildet. Man lässt 20 Min. bei ZT reagieren und gibt dann 0,209 g (10^{-3} Mol) Z-Glycin zum Reaktionsgemisch. Nach 4 Std. Rühren bei ZT wird das LM am Vakuum entfernt und der Rückstand analog 5* aufgearbeitet.

Ausbeute: 0,234 g (80%)

Produktdaten identisch mit 5*

Z-glycyl-glycin-äthylester 5e*

Darstellung analog 5d*, aber mit 0,250 ml ($2 \cdot 10^{-3}$ Mol) Di-äthylchlorphosphin anstelle von 10^{-3} Mol Aethyldichlorphosphin.

Reaktionsdauer: 70 Min./ZT

Ausbeute: 55%

Produktdaten identisch mit 5*

8. 3 Peptidsynthesen mit Phosphortrichlorid und Imidazol durch Carboxylaktivierung

Z-glycyl-glycin-äthylester 5f*

a) Mit 2 Chloratomen pro Z-Aminosäure

In einem mit trockenem Stickstoff gespülten Gefäß werden 0,408 g ($6 \cdot 10^{-3}$ Mol) Imidazol in 1 ml abs. CH_3CN vorgelegt, 0,059 ml ($0,67 \cdot 10^{-3}$ Mol) Phosphortrichlorid zugegeben und die Lösung bei ZT gerührt. Nach 10 Min. Reaktionszeit werden 2 ml CH_3CN , nach weiteren 5 Min. 0,209 g (10^{-3} Mol) Z-Glycin zugefügt, worauf sich sofort eine ölige Flüssigkeit in Form einer weissen Emulsion abscheidet. Man lässt 15 Min. reagieren bei ZT und gibt dann 0,140 g (10^{-3} Mol) Glycinäthylester-Hydrochlorid zu, wobei das Öl langsam verschwindet

und sich ein fester Niederschlag von Imidazol-Hydrochlorid bildet. Der Reaktionsverlauf wird auf DC verfolgt. Nach 1 Std. ist aller Glycinäthylester verschwunden, worauf die Lösung mit wenig H_2O versetzt und am Vakuum eingengt wird. Der leicht gelbe Rückstand wird analog 5* aufgearbeitet.

Ausbeute: 0,287 g (98%)

Produktdaten identisch mit 5*

b) Mit 1 Chloratom pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit $0,33 \cdot 10^{-3}$ Mol PCl_3

Reaktionsdauer: 4 Std./ZT

Ausbeute: 72%

Produktdaten identisch mit 5*

c) Mit 1,5 Chloratomen pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit $0,5 \cdot 10^{-3}$ Mol PCl_3

Reaktionsdauer: 4 Std./ZT

Ausbeute: 96%

Produktdaten identisch mit 5*

d) Mit 3 Chloratomen pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit 10^{-3} Mol PCl_3

Reaktionsdauer: 3 Std./ZT

Ausbeute: 78%

Produktdaten identisch mit 5*

Z-L-valyl-L-valin-methylester 7b*

Darstellung analog 5f*, aber mit einem Ueberschuss
(1,5 Aequivalente) an L-Valinmethylester-Hydrochlorid
Reaktionsdauer: 4 Std./ZT
Ausbeute: 93%
Produktdaten identisch mit 7*

8. 4 Peptidsynthesen mit Aethyldichlorphosphin und Imidazol
durch Carboxylaktivierung

Z-glycyl-glycin-äthylester 5g*

a) Mit 1 Chloratom pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit $0,5 \cdot 10^{-3}$ Mol EtPCl_2
Reaktionsdauer: $3\frac{1}{2}$ Std./ZT
Ausbeute: 83%
Produktdaten identisch mit 5*

b) Mit 2 Chloratomen pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit 10^{-3} Mol EtPCl_2
Reaktionsdauer: 1 Std./ZT
Ausbeute: 96%
Produktdaten identisch mit 5*

c) Mit 3 Chloratomen pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit $1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol EtPCl_2

Reaktionsdauer: 3 Std./ZT

Ausbeute: 84%

Produktdaten identisch mit 5*

Z-L-valyl-L-valin-methylester 7c*

Darstellung analog 5g* b), aber mit einem Ueberschuss

(1,5 Aequivalente) an L-Valinmethylester-Hydrochlorid

Reaktionsdauer: 18 Std./ZT

Ausbeute: 79%

Produktdaten identisch mit 7*

8. 5 Peptidsynthesen mit Diäthylchlorphosphin und Imidazol
durch Carboxylaktivierung

Z-glycyl-glycin-äthylester 5h*

a) Mit 1 Chloratom pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit 10^{-3} Mol Et_2PCl

Reaktionsdauer: 18 Std./ZT

Ausbeute: 82%

Produktdaten identisch mit 5*

b) Mit 2 Chloratomen pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit $2 \cdot 10^{-3}$ Mol Et_2PCl

Reaktionsdauer: 2 Std./ZT

Ausbeute: 98%

Produktdaten identisch mit 5*

c) Mit 3 Chloratomen pro Z-Aminosäure

Darstellung analog 5f*, aber mit $3 \cdot 10^{-3}$ Mol Et_2PCl

Reaktionsdauer: 1 Std./ZT

Ausbeute: 96%

Produktdaten identisch mit 5*

Z-valyl-valin-methylester 7d*

Darstellung analog 5h* b), aber mit einem Ueberschuss
(1,5 Aequivalente) an L-Valinmethylester-Hydrochlorid

Reaktionsdauer: 4 Std./ZT

Ausbeute: 92%

Produktdaten identisch mit 7*

8. 6 Peptidsynthesen mit Phosphortrichlorid nach der Phosphorazomethode zur Abklärung der Molverhältnisse im Vergleich zur Phosphor-Imidazol-Methode

Z-glycyl-glycin-äthylester 5i*

a) Mit 1,5 Chloratomen pro Aminosäureester

Nach S. Goldschmidt und H. Lautenschlager (7)

0,140 g (10^{-3} Mol) Glycinäthylester-Hydrochlorid werden in 4 ml abs. Py aufgeschlämmt und bei 0°C mit 0,044 ml ($0,5 \cdot 10^{-3}$ Mol) Phosphortrichlorid versetzt. Unter Rühren lässt man 30 Min. reagieren und gibt anschliessend 0,209 g (10^{-3} Mol) Z-Glycin zu. Der Reaktionsverlauf wird auf DC verfolgt. Nach 4 Std. Reaktionszeit wird wenig H_2O zugegeben und das LM am Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wird in EE aufgenommen, mit 2n HCl, ges. Na-bicarbonatlösung und H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Eindampfen der EE-Lösung erhält man farblose, ölige Kristalle. Umkristallisation aus EE/Pe liefert farblose Plättchen.

Ausbeute: 0,166 g (56%)

Produktdaten identisch mit 5*

b) Mit 2 Chloratomen pro Aminosäureester

Darstellung analog 5i*, aber mit $0,67 \cdot 10^{-3}$ Mol PCl_3

Reaktionsdauer: 4 Std./ZT

Ausbeute: 42%

Produktdaten identisch mit 5*

9. Racemisierungsuntersuchungen bei Peptidsynthesen mit Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen durch Carboxyl-aktivierung

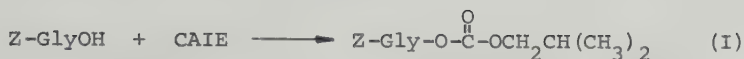
Die Racemisierungsuntersuchungen werden auf der Grundlage des von N. Izumiya und M. Muraoka (8,9) entwickelten Tests durchgeführt. Dabei wird das N-geschützte Dipeptid Z-Gly-L-AlaOH mit L-LeuOBu^t durch Aktivierung mit Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen zum N-geschützten Tripeptidester umgesetzt. Nach der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches werden die beiden Schutzgruppen abgespalten und das freie Tripeptid auf einem Aminosäureanalysator in die beiden Epimeren Gly-L-Ala-L-LeuOH und Gly-D-Ala-L-LeuOH aufgetrennt. Die quantitative Auswertung erfolgt durch Ausmessen der Peakflächen der L-L-Form und der D-L-Form, was gleichzeitig anhand des zugesetzten Val-Standards eine Ausbeutebestimmung ermöglicht.

9. 1 Ausgangssubstanzen

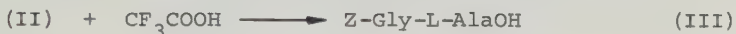
Die Ausgangssubstanzen wurden in freundlicher Weise von Herrn Dr. F. Cardinaux zur Verfügung gestellt, dem ich an dieser Stelle dafür sowie für seine wertvollen Hinweise bei der Durchführung der Tests herzlich danken möchte.

Z-Gly-L-AlaOH

Z-GlyOH wird durch Umsetzung mit Chlorameisensäure-isobutylester (CAIE) in das gemischte Boissonas-Anhydrid überführt und mit L-AlaOBu^t zum Z-Dipeptidester gekuppelt.



Durch Zugabe von TFA zu (II) wird die t-Butylester-Schutzgruppe abgespalten, worauf das Produkt aus EE umkristallisiert wird.



Produktdaten von (III)

Literaturdaten (9)

Smp.: 134 - 135°C

133°C

$[\alpha]_D^{25}$: -10,5° (c=3,2/EtOH)

-9,8° (c=4,4/EtOH)

Analyse: C,H,N innerhalb 0,3% des theoretischen Wertes

L-LeuOBu^t

In einer Druckflasche wird L-LeuOH in Dioxan zusammen mit konz. H₂SO₄ vorgelegt und dazu bei -75°C ein Ueberschuss an Isobutylen kondensiert. Die Druckflasche wird verschlossen bei ZT während 72 Std. geschüttelt. Das überschüssige Isobutylen wird entfernt, der Rückstand in 2n NaOH-Lösung gegossen und mit Aether extrahiert. Die Aetherlösung wird mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und der Aether abdestilliert. Der rohe L-Leucin-t-butylester wird durch Vakuumdestillation gereinigt.



Produktdaten von (I)

Literaturdaten (10)

Sdp.: 50°C/0,5 Torr

45°C/0,15 Torr

Dichte: 0,92 g/ml

0,899 g/ml

$[\alpha]_D^{25}$: +20,2° (c=2/EtOH)

+21,6° (c=2,5/EtOH)

Analyse: C,H,N innerhalb 0,3% des theoretischen Wertes

9. 2 Darstellung von Gly-?-Ala-L-LeuOH 10* mit Diäthylchlorphosphin und Imidazol durch Carboxylaktivierung

Z-Gly-?-Ala-L-LeuOBu^t

In einem mit trockenem Stickstoff gespülten Gefäß werden 73 mg ($1,07 \cdot 10^{-3}$ Mol) Imidazol in 0,3 ml Acetonitril auf 0°C abgekühlt und unter Rühren mit 44 µl ($0,36 \cdot 10^{-3}$ Mol) Et₂PCl versetzt. Nach 10 Min. Reaktionszeit bei ZT werden 0,3 ml CH₃CN, nach weiteren 5 Min. 50 mg ($0,178 \cdot 10^{-3}$ Mol) Z-Gly-L-AlaOH zugegeben. Man lässt bei ZT 15 Min. reagieren und gibt dann mit der Spritze 55 µl ($0,268 \cdot 10^{-3}$ Mol), also einen 1,5-fachen Ueberschuss, L-LeuOBu^t zu. Der Reaktionsverlauf wird nach 3 Std. auf DC kontrolliert, wobei nur noch wenig Z-Gly-L-AlaOH nachgewiesen werden kann. Nach 4 Std. Reaktionszeit wird die Lösung in EE aufgenommen, mit 0,5 m K₂SO₄/KHSO₄-Lösung, zehnpromzentiger KHCO₃ und H₂O ausgeschüttelt und die EE-Lösung über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Eindampfen des EE am Vakuum erhält man ein klares, farbloses Oel, das nach mehrstündigem Trocknen am Wasserstahlvakuum in rosettenförmigen Nadeln kristallisiert.

Gly-?-Ala-L-LeuOBu^t

Das Z-Gly-?-Ala-L-LeuOBu^t wird in 8 ml 80%-iger AcOH gelöst, mit 10 mg Katalysator (10% Pd auf Aktivkohle) versetzt und unter Rühren an einer Kleinhydrierapparatur am Wasserstoffdurchfluss hydriert. Nach 3 1/2 Std. ist die Carbobenzoxyschutzgruppe vollständig abgespalten (DC-Kontrolle). Der Katalysator wird durch vorsichtiges Abnutschen über Cellit aus der Lösung entfernt und die Essigsäure bei 30°C am Vakuum eingedampft. Das Produkt bleibt in Form eines leicht gelben Oels zurück.

HCl.Gly-?-Ala-L-LeuOH

Das ölige Gly-?-Ala-L-LeuOBu^t wird mit 2 ml 10n HCl versetzt und bei ZT während 3 Min. reagieren gelassen. Dabei entsteht im geschlossenen Gefäß durch das freiwerdende Isobutylen ein Ueberdruck, aus dessen Nachlassen auf das Ende der Hydrolyse geschlossen werden kann. Die Salzsäure wird anschließend erst am Wasserstrahlvakuum bei 30°C, dann am HV vollständig entfernt, der ölige Rückstand in 4 ml H₂O aufgenommen, die Lösung bei -20°C eingefroren und am HV bei 10⁻² Torr lyophilisiert. Durch die Gefriertrocknung erhält man das Hydrochlorid des Tripeptids in Form eines leicht graubraunen Pulvers.

Standardlösung für die Racemisierungsuntersuchung

Das Tripeptid-Hydrochlorid HCl.Gly-?-Ala-L-LeuOH wird in 5,00 ml H₂O gelöst. Von dieser Lösung wird 1,00 ml in einen 10 ml Masskolben überführt, 1,00 ml Val-Standardlösung als

Vergleich zugegeben und der Kolben mit Auftragepuffer (pH 2) bis zur Marke aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 20 ml auf die Ionenaustauschersäule des Aminosäureanalysators aufgetragen.

Der Rest der wässrigen Lösung wird für die Substanzcharakterisierung weiter gereinigt.

Reinigung des HCl.Gly-?-Ala-L-LeuOH

Aufbereiten von Ionenaustauscher Amberlite IR-45

Eine Chromatographiersäule wird mit 25 ml feuchtem Ionenaustauscher beschickt und mit 1n NaOH eluiert, bis im Eluat mit AgNO_3 -Lösung keine Chloridionen mehr nachgewiesen werden können. Mit 150 ml H_2O wird neutralgewaschen (Lackmus) und der Ionenaustauscher anschliessend mit 100 ml 5%-iger AcOH in die neutrale Acetatform überführt. Die überschüssige Essigsäure wird mit 50 ml H_2O weggespült.

Freisetzung des Tripeptids aus dem Tripeptid-Hydrochlorid

Es wird eine Säule mit 8 ml Feuchtsubstanz des regenerierten Ionenaustauschers Amberlite IR-45 präpariert. Der Rest der wässrigen Lösung von HCl.Gly-?-Ala-L-LeuOH (4 ml) wird aufgetragen und mit H_2O eluiert. Es werden 3 Fraktionen à 10 ml aufgefangen, ohne dass im Eluat Chloridionen nachgewiesen werden können (Silbernitrat-Test). Das Eluat wird am Vakuum bei 40°C eingedampft, wobei das freie Tripeptid in Form farbloser Kristalle ausfällt. Beim Umkristallisieren aus $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ erhält man farblose, verfilzte Nadelchen.

Ausbeute: 42,5 mg (92%)

Smp.: 239 - 240°C

$[\alpha]_D^{25}$: -85,1° (c=1/0,1 n HCl)

DC in d): R_f ca. 0,45, Ninhydrin positiv, wenig L-LeuOH ist noch nachweisbar.

$C_{11}H_{21}N_3O_4$		C	H	N
(259,3)	ber.	50,95%	8,16%	16,21%
	gef.	50,66%	8,34%	16,08%

9. 3 Darstellung von Gly-?-Ala-L-LeuOH 10a* mit Phosphor-trichlorid und Imidazol durch Carboxylaktivierung

Darstellung analog 10*, aber mit 16,3 mg ($0,12 \cdot 10^{-3}$ Mol) PCl_3 anstelle von $0,36 \cdot 10^{-3}$ Mol Et_2PCl . Ausserdem wird kein 1,5-facher Ueberschuss, sondern eine äquivalente Menge ($0,178 \cdot 10^{-3}$ Mol) an L-LeuOBu^t eingesetzt.

Reaktionsdauer: 4 Std./ZT

Ausbeute: 50,2 mg (95%)

Produktdaten des freien Tripeptids identisch mit 10*

Standardlösung für die Racemisierungsuntersuchung

Das Tripeptid-Hydrochlorid 10a* wird in 4 ml H_2O gelöst, 2 ml davon in einem Masskolben mit 1 ml Val-Standard versetzt und die Lösung mit Auftragepuffer (pH 2) auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird analog 10* auf dem Aminosäure-analysator chromatographiert.

Racemisierung bei der Kupplung von 1 Mol Z-Gly-L-AlaOH mit 1 Mol L-LeuOBu^t nach der Phosphor-Imidazol-Methode mit Carboxylaktivierung in CH₃CN bei ZT

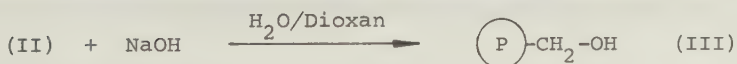
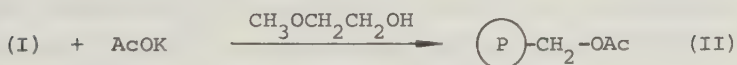
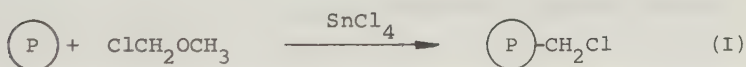
P ^{III} - Chlorid	Mol P ^{III}	Ausbeute Analyse	Retention L-L	Inversion D-L
PCl ₃	0,67	77%	95,2%	4,8%
Et ₂ PCl *)	2	86%	94,3%	5,7%

*) Diese Synthese wurde mit 1,5 Mol L-LeuOBu^t auf 1 Mol Z-Gly-L-AlaOH durchgeführt.

10. Phosphor-III-Imidazol-Verbindungen als Carboxylaktivierungsmittel bei der Festphasensynthese von Peptiden

10. 1 Darstellung der Aminoacylharze

Als Träger wird ausschliesslich das handelsübliche, mit 2% Divinylbenzol (DVB) quervernetzte Polystyrolharz mit einer Korngrösse von 200 - 400 mesh verwendet (Fluka AG, Buchs). Die Einführung der Chlormethylgruppen als reaktiven Zentren geschieht durch Umsetzung des Harzes mit einem Ueberschuss an Chlormethyl-methyläther am Rückfluss unter Zusatz von Zinntetrachlorid als Katalysator. Die Chlormethylgruppen werden anschliessend mit Kaliumacetat in siedender Methylcellosolve acyliert und dann mit 1n NaOH in H₂O/Dioxan am Rückfluss hydrolysiert.



Auf das Hydroximethylharz (III) wird die carboxylendständige Boc-Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids mit CBI in CH₂Cl₂ als LM aufgekuppelt. Durch Verwendung von Boc-Glycin, Boc-Phenylalanin und Boc-Valin werden drei verschiedene Harztypen hergestellt.



10. 2 Synthese von Dipeptiden auf dem Harz

10. 2. 1 Schema der Kupplungen

Das Programm für einen Kupplungsschritt bei den durchgeführten Peptidsynthesen nach der Merrifield-Methode (11) umfasst vier Hauptstufen:

1. Boc-Schutzgruppenabspaltung von der Aminosäure auf dem Harz mit 4n HCl in H₂O/Dioxan.
2. Bestimmung der Beladung des Harzes mit freien Aminogruppen durch Titration der mit Triäthylamin (TEA) freigesetzten Salzsäure mit Silbernitratlösung.
3. Kupplung der freien Aminogruppen mit einer Boc-Aminosäure nach der Phosphor-Imidazol-Methode.
4. Bestimmung der Ausbeute des Kupplungsschrittes durch Umsetzen der noch freien Aminogruppen mit 2-Hydroxy-1-naphtaldehyd, Abwaschen des überschüssigen Reagens', Freisetzen des fixierten Aldehyds mit Benzylamin und Bestimmen der Extinktion der Lösung bei 424 nm (Esko-Methode (12)).

Die vier Hauptstufen der Synthese sind ihrerseits in mehrere Schritte unterteilt. Ein einzelner Syntheseyklus wird durch das Schema auf der nächsten Seite beschrieben.

1. Boc-Schutzgruppenabspaltung

<u>Operation: Art</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Dauer (Min.)</u>
Spülen mit Dioxan	3	2,5
Vorspülen mit 4n HCl/Dioxan	1	5
Deblockieren mit 4n HCl/Dioxan	1	120
Spülen mit Dioxan	10	2,5

2. Bestimmung der Beladung mit freien Aminogruppen

Spülen mit t-BuOH/Dioxan 2:1	6	2,5
Spülen mit TEA/t-BuOH/Dioxan 1:6:3	3	2,5
Spülen mit t-BuOH/Dioxan	5	2,5

3. Kupplung mit Boc-Aminosäure

Spülen mit CH_2Cl_2 *)	3	2,5
Reaktion mit Boc-Aminosäure		
+ Kupplungsreagens	1	60
Spülen mit CH_2Cl_2 *)	3	2,5

*) bzw. mit anderem bei der Kupplung verwendetem LM

4. Ausbeutebestimmung nach Esko (12)

Das Flottenverhältnis beträgt bei allen Schritten generell 15 ml LM pro g Harz bei Spüloperationen und 10 ml Lösung pro g Harz bei Reaktionen.

10. 2. 2 Kupplungsbedingungen

Auf den verwendeten Harztypen (Boc-Gly-, Boc-Phe- und Boc-Val-Harz) sind jeweils $0,8 \cdot 10^{-3}$ Mol Boc-Aminosäure pro g Harz fixiert. Bei der Verwendung von rund 50 mg Boc-Aminoacylharz für jeden Versuch ergibt das $4 \cdot 10^{-5}$ Mol kupplungsfähiger Aminokomponente pro Ansatz. Die Kupplungen werden in einem geschlossenen, mit einem Rührer versehenen und thermostatisierten Reaktionsgefäß mit Frittenboden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Das Kupplungsreagens wird in einem Gefäß ausserhalb des eigentlichen Reaktors vorbereitet und in einem 150%-igen Ueberschuss (10^{-4} Mol pro Ansatz) mit der Aminokomponente auf dem Harz zur Reaktion gebracht, wobei stets eine Konzentration von 2 mMol Reagens pro 10 ml LM eingehalten wird. Als Carboxylkomponente dient ausschliesslich Boc-Glycin. Es werden immer 6 Mol Imidazol auf 1 Mol Boc-Glycin zugesetzt, wohingegen die verschiedenen Phosphor-III-Verbindungen in den unter Kap. 4. 2. 2 beschriebenen optimalen Verhältnissen zugegeben werden, also 0,67 Mol PCl_3 , 1 Mol EtPCl_2 und 2 Mol Et_2PCl pro Mol Boc-Aminosäure. Die Darstellung der aktivierten Kupplungskomponente erfolgt nach vier verschiedenen Methoden.

Zugabevariante A:

Imidazol in LM vorlegen, P-III-Verbindung in LM gelöst unter Rühren zugeben und bei ZT reagieren lassen. Nach 5 Min. das Boc-Glycin in LM zugeben, 5 Min. rühren und das Reaktionsgemisch zum Aminoacylharz giessen.

Zugabevariante B:

Imidazol gemeinsam mit Boc-Glycin in LM vorlegen, P-III-Verbindung in LM unter Rühren zugeben, bei ZT während 5 Min. reagieren lassen und das Reaktionsgemisch zum Harz zugeben.

Zugabevariante C:

Imidazol und Boc-Glycin in LM zum Aminoacylharz giessen und 5 Min. warten. Danach die P-III-Verbindung in LM zugeben und schütteln.

Zugabevariante D:

P-III-Verbindung in LM gelöst zum Aminoacylharz geben und bei ZT reagieren lassen. Nach 5 Min. das Boc-Glycin in LM zugiessen, 5 Min. warten und dann das Imidazol in LM zugeben.

Alle Kupplungsreaktionen werden bei 25°C durchgeführt und dauern jeweils 1 Std.. Als Lösungsmittel werden CH_2Cl_2 , Dioxan und Acetonitril eingesetzt.

Kupplungen von Boc-Glycin (1 Mol) auf verschiedene Amino-
acylharze bei ZT. Reaktionsdauer: 1 Std.

Harztyp (0,4 Mol)	P ^{III} - Verbdg.	Mol P ^{III}	Zugabe- variante	LM	Ausbeute Esko (12)
Boc-Gly	PCl ₃	0,67	B	CH ₂ Cl ₂	97,6 %
"	EtPCl ₂	1	B	"	93,0 %
"	Et ₂ PCl	2	A	"	86,2 %
"	"	2	B	"	97,7 %
"	"	2	C	"	91,6 %
"	"	2	D	"	70,2 %
"	"	2	B	Dioxan	80,7 %
"	"	2	B	CH ₃ CN	81,0 %
Boc-Phe	PCl ₃	0,67	B	CH ₂ Cl ₂	86,7 %
"	Et ₂ PCl	2	B	"	78,9 %
Boc-Val	PCl ₃	0,67	B	"	94,9 %
"	Et ₂ PCl	2	B	"	86,3 %

10. 3 Racemisierung bei Peptidsynthesen mit PCl_3 und Imidazol nach der Solid-phase-Methode

Wie die Racemisierungsuntersuchungen bei den klassischen Kupplungen nach der Phosphor-Imidazol-Methode (s. Kap. 9) stützen sich auch die Analysen bei der Merrifield-Synthese auf den von Izumiya et al. (8,9) entwickelten Test. Anders als bei den Kupplungen in Lösung wird aber nicht das N-geschützte Dipeptid Z-Gly-L-AlaOH an den L-Leu-Ester gekuppelt, sondern das Tripeptid durch schrittweise Verknüpfung der einzelnen Komponenten in Form der N-Boc-geschützten Aminosäuren dargestellt. Als Ausgangsmaterial dient das Boc-Leu-Harz. Die Versuche werden mit PCl_3 als Phosphorkomponente durchgeführt.

10. 3. 1 Darstellung des Boc-L-Leu-Harzes

Das Trägerharz besteht aus mit 2% DVB quervernetztem Polystyrol, das in Form von Kügelchen mit einer Korngrösse von 200-400 mesh von der Fluka AG, Buchs SG, bezogen wird. Die Einführung der Hydroximethylgruppen geschieht nach der unter Kap. 10. 1 beschriebenen Vorschrift via Chlormethylharz und acyliertes Hydroximethylharz. Das Boc-L-LeuOH wird analog den Boc-Aminosäuren in Kap. 10. 1 mit CBI in CH_2Cl_2 auf das Hydroximethylharz aufgekuppelt.

10. 3. 2 Kupplungsschema

Das Schema der Kupplungen ist dasselbe wie bei der unter Kap. 10. 2. 1 beschriebenen Synthese von Dipeptiden. Dabei wird in einer ersten Stufe die Boc-Schutzgruppe der Amino-

säure oder des Peptids auf dem Harz mit 4n HCl in Dioxan abgespalten. In einer zweiten Stufe wird die Beladung des Harzes mit freien Aminogruppen durch Auswaschen der HCl mit TEA und Titration mit Silbernitrat quantitativ bestimmt. Die dritte Stufe umfasst die Kupplung der freien Aminogruppen mit der nächsten, durch Phosphortrichlorid-Imidazol-Reagens aktivierten Boc-Aminosäure. Die vierte und letzte Stufe besteht in der analytischen Erfassung der Ausbeute des Kupplungsschrittes durch Ueberführen der unreaktierten Aminogruppen in die Hydrochlorid-Form mit Py.HCl , auswaschen der HCl mit TEA und Titration der Chloridionen mit Silbernitrat.

10. 3. 3 Kupplungsbedingungen

Es wird jeweils 1 g Aminoacylharz, auf dem $0,8 \cdot 10^{-3}$ Mol Boc-L-Leucin fixiert sind, für die Synthese des Tripeptids eingesetzt. Die Kupplungen werden in einem Frittenbodengefäss mit Rührer unter Stickstoff durchgeführt.

In einem Gefäss ausserhalb des Reaktors werden $2 \cdot 10^{-3}$ Mol aktivierte Boc-Aminosäure in 10 ml CH_2Cl_2 vorbereitet, wobei die Molverhältnisse immer 0,67 Mol PCl_3 und 6 Mol Imidazol pro Mol Boc-Aminosäure betragen. Die Vorbereitung des Kupplungsreagens geschieht auf zwei verschiedene Arten.

Variante A:

Boc-Aminosäure und Imidazol in CH_2Cl_2 vorlegen, PCl_3 innert 5 Min. zugeben und nach 5 Min. Reaktionszeit zum Aminoacylharz giessen.

Variante B:

PCl_3 in CH_2Cl_2 vorlegen, Boc-Aminosäure und Imidazol in CH_2Cl_2 zugeben, 5 Min. reagieren lassen und dann zum Aminoacylharz giessen.

Nach 3 Std. Reaktionszeit bei ZT filtriert man die Lösung ab, bestimmt die Ausbeute und spaltet die Boc-Schutzgruppe für den nächsten Schritt ab. Im ersten Kupplungsschritt wird Boc-L-AlaOH, im zweiten Boc-GlyOH als Säurekomponente eingesetzt. Nach beendigter Synthese wird das Tripeptid vom Harz abgespalten, in Auftragepuffer gelöst und eine definierte Menge davon auf einem Aminosäureanalysator chromatographiert.

Racemisierung bei der Solid-phase-Synthese von Gly-?-Ala-L-LeuOH mit PCl_3 -Imidazol-Reagens in CH_2Cl_2 bei ZT

Harztyp	Zugabe- variante	Retention L-L	Inversion D-L
Boc-Leu	A	55,0%	45,0%
Boc-Leu	B	48,7%	51,3%

Zusammenfassung

Nachdem die Versuche von U. Giger (14) gezeigt hatten, dass Alkyl- und Arylsubstituenten am Phosphor eine beschleunigende Wirkung auf die Amidsynthese aus Phosphonig-imiden und Carbonsäuren haben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Reaktivität von verschiedenen Alkylchlorphosphinen weiter untersucht. Die Resultate von Giger mit Aethylphosphonig-imiden konnten von uns nicht reproduziert werden, doch zeigt sich eine deutliche Zunahme der Kupplungsgeschwindigkeit bei Peptidsynthesen in der Reihe $\text{PCl}_3 < \text{MePCl}_2 < \text{EtPCl}_2 < \text{Et}_2\text{PCl}$ als Aminoaktivierungsmittel. Die grosse Reaktionsgeschwindigkeit und die Molverhältnisse bei den Kupplungen mit Et_2PCl führten zu einer Neuformulierung des Mechanismus des Kupplungsschrittes, der nach unseren Vorstellungen bimolekular und nicht, wie bisher angenommen (13,14), intramolekular verläuft.

Die Umsetzungsprodukte von Chlorphosphinen mit Imidazol wurden ebenfalls für Peptidsynthesen eingesetzt. Bei der Aktivierung der Carboxylkomponente mit Phosphor-Imidazol-Reagentien bildet sich wahrscheinlich ein Carbonsäure-imidazolid, das mit der Aminokomponente rasch und vollständig zum Peptid reagiert. Racemisierungsuntersuchungen ergeben nur geringen Verlust der sterischen Einheitlichkeit.

Die Phosphor-Imidazol-Methode wurde auch bei Solid-phase-Synthesen von Peptiden eingesetzt und ergab gute Ausbeuten, doch führte sie hier, im Gegensatz zu den Versuchen in Lösung, seltsamerweise zur vollständigen Racemisierung der Produkte.

Literaturverzeichnis

- 1 E. Stahl, "Dünnschichtchromatographie", Springer Verlag, Berlin 1962, S. 509
- 2 Vgl. (1), S. 501
- 3 R. Schliebs, H. Kaiser, DAS 1'119'860 (1959) Farbf. Bayer
- 4 J.L. Feron, B.J. Perry, J.B. Reesor, Can. J. Chem. 41, 2299 (1963)
- 5 I.P. Komkov, K.V. Karavanov, S.Z. Ivin, Zh. Obshch. Khim. 28, 2963 (1958), C.A. 53, 9035 (1959)
- 6 H. Schüssler, H. Zahn, Ber. 95, 1076 (1962)
- 7 S. Goldschmidt, H. Lautenschlager, Ann. 580, 68 (1953)
- 8 N. Izumiya, M. Muraoka, JACS 91, 2391 (1969)
- 9 N. Izumiya, M. Muraoka, H. Aoyagi, Bull. Chem. Soc. Jap. 44, 3391 (1971)
- 10 G.W. Anderson, F.M. Callahan, JACS 82, 3359 (1960)
- 11 J.M. Stewart, J.D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis" W.H. Freeman, San Francisco 1969
- 12 K. Esko, S. Karlsson, Acta Chem. Scand. 24, 1415 (1970)
- 13 W. Grassmann, E. Wünsch, Ber. 91, 455 (1958)
- 14 U. Giger, Dissertation Univ. Basel 1970
- 15 Y.V. Mitin, O.V. Glinskaya, Tetr. Letters 1969, 5267
- 16 Y.V. Mitin, O.V. Glinskaya, Zh. Obshch. Khim. 41, 1151 (1971), C.A. 75, 77257 v (1971)
- 17 Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", Bd. 12/1
- 18 A.J. Kirby, S.G. Warren, "The Organic Chemistry of Phosphorus", Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1967, S. 32
- 19 R. Appel, A. Hauss, Ber. 93, 465 (1960)
- 20 H. Sisler, A. Sarkis, H.S. Ahuja, R.J. Drago, N.L. Smith JACS 81, 2982 (1959)
- 21 H.H. Wassermann, R.C. Koch, Chem. Ind. 1956, 1014
- 22 Vgl. (18), S. 244

- 23 A. Michaelis, Ann. 326, 129 (1903)
- 24 A. Michaelis, Ann. 326, 149 (1903)
- 25 G.S. Harris, J. Chem. Soc. 1958, 512
- 26 H.W. Grimmel, A. Günther, J.F. Morgan, JACS 68, 539 (1946)
- 27 H.W. Grimmel, A. Günther, JACS 68, 593 (1946)
- 28 S. Goldschmidt, H. Lautenschlager, Ann. 580, 68 (1953)
- 29 S. Goldschmidt, C. Jutz, Ber. 80, 518 (1946)
- 30 S. Goldschmidt, C. Jutz, Ber. 86, 1116 (1953)
- 31 O. Süss, Ann. 572, 96 (1951)
- 32 G.W. Anderson, J. Blodinger, R.W. Young, A.D. Welcher, JACS 74, 5304 (1952)
- 33 G.W. Anderson, J. Blodinger, A.D. Welcher, JACS 74, 5309 (1952)
- 34 S. Goldschmidt, F. Obermeier, Ann. 588, 24 (1954)
- 35 R.W. Young, K.H. Wood, R.J. Joyce, G.W. Anderson, JACS 78, 2126 (1956)
- 36 Y.V. Mitin, O.V. Glinskaya, Zh. Obshch. Khim. 39, 1287 (1969), C.A. 71, 70919 w (1969)
- 37 Vgl. (18), S. 2
- 38 G.J. Drozd, Zh. Obshch. Khim. 38, 1653 (1968)
- 39 T. Mukaiyama, M. Ueki, H. Maruyama, R. Matsueda, JACS 90, 4490 (1968)
- 40 T. Mukaiyama, M. Ueki, H. Maruyama, R. Matsueda, JACS 91, 1554 (1969)
- 41 T. Mukaiyama, R. Matsueda, M. Suzuki, Tetr. Letters 1970, 1901
- 42 R.F. Hudson, "Structure and Mechanism in Organo-Phosphorus Chemistry", Academic Press, London-New York, 1965, S.11
- 43 C.T. Mortimer, "Reaction Heats and Bond Strengths", Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, 1962, S. 198
- 44 W. Grassmann, E. Wünsch, Ber. 91, 449 (1958)
- 45 R.C. Miller, J. Org. Chem. 24, 2013 (1959)
- 46 C. Walling, A.P. 2'437'798 (1944), Du Pont

- 47 W.A. Henderson, S.A. Buckler, N.E. Day, M. Grayson,
J. Org. Chem. 26, 4770 (1961)
- 48 A. Michaelis, H.v. Soden, Ann. 229, 303 (1885)
- 49 J.N. Collie, F. Reynolds, J. Chem. Soc. 107, 367 (1915)
- 50 C. Stuebe, W.M. Lesuer, G.R. Norman, JACS 77, 3526 (1955)
- 51 F.G. Mann, I.T. Miller, J. Chem. Soc. 1952, 4453
- 52 A.B. Burg, P.J. Slota, JACS 80, 1107 (1958)
- 53 M. Brenner, J. Cell. and Comp. Physiol. 54, 221 (1959)
- 54 J.R. Van Wazer, C.F. Callis, J.N. Shoolery, R.C. Jones,
JACS 78, 5715 (1956)
- 55 S. Goldschmidt, H.L. Krauss, Ann. 595, 193 (1955)
- 56 I. Fleming, D.H. Williams, "Spectroscopic Methods in
Organic Chemistry", Mc Graw-Hill Publishing Company Ltd.
London, 1966, S. 69
- 57 H.A. Staab, M. Lüking, F.H. Dürr, Ber. 95, 1275 (1962)
- 58 Th. Wieland, G. Schneider, Ann. 580, 159 (1953)
- 59 O. Gerngross, Ber. 46, 1912 (1913)
- 60 S. Goldschmidt, K.K. Gupta, Ber. 98, 2831 (1965)
- 61 A.W. Williams, G.T. Young, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I
1972, 1194
- 62 M. Bergmann, L. Zervas, Biochem. Z. 1928, 280
- 63 M. Bodanszky, M.A. Ondetti, "Peptide Synthesis", Inter-
science Publishers, 1966, S. 137 ff
- 64 Vgl. (32), S. 5307
- 65 G.W. Anderson, F.M. Callahan, JACS 80, 2902 (1958)
- 66 F. Weygand, D. Hoffmann, A. Prox, Z. Naturforsch. 23b,
279 (1968)
- 67 N.A. Smart, G.T. Young, M.W. Williams, J. Chem. Soc.
1960, 3902
- 68 A.L. Heard, G.T. Young, J. Chem. Soc. 1963, 5807
- 69 B. Weinstein, A.E. Pritchard, J. Chem. Soc., Perkin
Trans. I 1972, 1015
- 70 IUPAC-IUB, J. Biol. Chem. 241, 2491 (1966)

- 71 Vgl. (42), S. 33
- 72 K.S. Pitzer, JACS 70, 2140 (1948)
- 73 G. Ewart, D.S. Payne, A.L. Porte, J. Chem. Soc. 1962, 3984
- 74 G.W. Anderson, Ann N.Y. Acad. Sci. 88, 686 (1960)
- 75 G. Gawne, G.W. Kenner, R.C. Sheppard, JACS 91, 5669 (1969)
- 76 B. Castro, J.C. Dormoy, Bull. Soc. Chim. France 1971,3034
- 77 L.E. Barstov, V.J. Hruby, J. Org. Chem. 36, 1305 (1971)
- 78 Th. Wieland, A. Seeliger, Ber. 104, 3992, (1971)
- 79 G. Gawne, G.W. Kenner, R.C. Sheppard, "Peptides 1969", North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, S. 23
- 80 Y.V. Mitin, G.P. Vlasov, Ber. Akad. Wiss. UdSSR 179, 353 (1968), C.A. 69, 77719 y (1968)
- 81 B. Castro, J.R. Dormoy, Tetr. Letters 1972, 4747
- 82 H.D. Jakubke, A. Voigt, Ber. 99, 2419 (1966)
- 83 J.H. Jones, G.T. Young, Chem. Comm. 1967, 35
- 84 N. Clauson-Kaas, Acta Chem. Scand. 1, 884 (1947)
- 85 G.W. Anderson, R. Paul, JACS 82, 4596 (1960)
- 86 L. Birkofer, W. Gilgenberg, A. Ritter, Angew. Chem. 73, 143 (1961)
- 87 W.P. Jencks, "Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes", Academic Press, London-New York, 1970, S. 64
- 88 M. Bergmann, L. Zervas, Z. Physiol. Chem. 175, 145 (1928)
- 89 T.C. Bruice, S. Benkovic, "Bioorganic Mechanisms", W.A. Benjamin, New York-Amsterdam, 1966, S. 65
- 90 W.P. Jencks, J. Carriulo, J. Biol. Chem. 234, 1272 (1959)
- 91 A.I. Vogel, "Practical Organic Chemistry", Longmans, London, 1961, S. 163 ff
- 92 R.B. Merrifield, V. Littau, Proc. European Peptide Symp. 9th, Orsay, 1968, S. 179

Curriculum vitae

Als Sohn des Ernst Tschopp, Filialleiter, von Ziefen/BL, und der Hilda, geb. Dürrenberger, wurde ich, Anton Ferdinand Tschopp, am 19. September 1944 in Ziefen geboren.

In Ziefen besuchte ich die Primarschule und in Reigoldswil/BL die Realschule, anschliessend die Oberstufe des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Basel, wo ich 1964 die Maturitätsprüfung Typus C bestand.

Im Sommersemester 1964 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und belegte Chemie als Hauptfach, Mathematik, Physik, physikalische Chemie und Astronomie als Nebenfächer. Im Oktober 1965 bestand ich das erste Vordiplom (anorganische Chemie, organische Chemie, Mathematik), im Oktober 1967 das zweite Vordiplom (Physik, Astronomie) und im Oktober 1968 das Diplomexamen (anorganische Chemie, organische Chemie, physikalische Chemie). Die Arbeiten an der vorliegenden Dissertation begann ich unter der Leitung von Prof. M. Brenner im Januar 1969.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Dozenten:

H. Balli, E. Baumgartner, K. Becker, M. Brenner, H. Brintzinger
P. Buchner, H. Erlenmeyer, S. Fallab, C. Grob, P. Hemmerich,
P. Huber, H. Kuhn, B. Prijs, Th. Reichstein, P. Schiess,
H. Seiler, H. Sigel, Ch. Tamm, M. Thürkauf, R. Wizinger,
R. Zürcher.

